

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Karl Mitt

**eGFP-ekspresseeriva rinoviirus A16 kontsentreerimine ning tootmistingimuste
optimeerimine HeLa rakuliinis**

Bakalaureusetöö, 12 EAP
Geenitehnoloogia

Juhendajad MSc Alar Aab
PhD Reet Kurg

TARTU 2016

SISUKORD

| | |
|--|----|
| KASUTATUD LÜHENDID | 4 |
| SISSEJUHATUS | 5 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 6 |
| 1.1. Rinoviiruste klassifikatsioon..... | 6 |
| 1.2. Rinoviiruse ehitus | 7 |
| 1.2.1 Genoom | 7 |
| 1.2.2 Virioon | 8 |
| 1.3. Viirusinfektsioon | 9 |
| 1.3.1. Rakureseptorid | 9 |
| 1.3.2. Viiruse sisenemine rakku | 10 |
| 1.3.3. Viiruse translatsioon ja replikatsioon | 10 |
| 1.4. Rinoviiruste poolt põhjustatavad terviseprobleemid | 12 |
| 1.5. Rinoviirus A16..... | 13 |
| 1.5.1. Rinoviirus A16-eGFP konstrueerimine..... | 13 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA | 15 |
| 2.1. Töö eesmärgid..... | 15 |
| 2.2. Materjal ja meetodika | 15 |
| 2.2.1. Kasutatud rakuliinid ja söötmed..... | 15 |
| 2.2.2. Kasutatud viirus..... | 16 |
| 2.2.3. Rakkude nakatamine rinoviirus A16-eGFP-ga | 16 |
| 2.2.4. Viiruse kontsentreerimine | 17 |
| 2.2.5. Viiruse tiitri määramine | 17 |
| 2.2.6. Rakkude analüüs läbivoolutsütomeetria | 18 |
| 2.2.7. Fluorestsentsmikroskoopia..... | 18 |
| 2.2.8. Statistiline analüüs..... | 19 |
| 2.3. TULEMUSED | 20 |
| 2.3.1. Rinoviiruse kontsentreerimine ning kontsentreerimata ja kontsentreeritud viiruse nakatumisvõime võrdlus | 20 |
| 2.3.2. Rinoviirus A16-eGFP-ga nakatumise dünaamika analüüs..... | 21 |
| 2.3.3. RV A16-eGFP visualiseerimise meetodite võrdlus | 24 |
| 2.4. ARUTELU | 28 |
| KOKKUVÕTE | 31 |
| SUMMARY | 32 |
| TÄNUSÕNAD | 33 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 34 |
| LIHTLITSENTS..... | 39 |

eGFP-ekspresseeriva rinoviirus A16 kontsentreerimine ning tootmistingimuste optimeerimine HeLa rakuliinis

Inimese rinoviirused on väikesed üheaahelalised RNA viirused, mida peetakse mitmete terviseprobleemide, näiteks ülemiste hingamisteede haiguste põhjustajateks. Rinoviiruseid seostatakse ka mitmete alumiste hingamisteede komplikatsioonidega, näiteks bronhiit, kopsupõletik ning astma ägenemine. Tööle eelneva HeLa rakkude viirusliku RNA-ga transfekteerimise tulemusel saadi eGFP-ekspresseeriv rinoviirus A16. Antud töö peamiseks eesmärgiks oli viiruse kontsentreerimise optimeeritud meetodi väljatöötamine. Käesolevas töös esitatud tulemustest võib järeldada, et ultratsentrifuugimine on efektiivne meetod eGFP-ekspresseeriva rinoviirus A16 kontsentreerimiseks, ning et sobivaim ajapunkt viiruse kogumiseks HeLa rakkudest on 72 tundi pärast rakkude nakatamist viirusega.

Märksõnad: rinoviirus, eGFP-ekspresseeriv rinoviirus, rinoviiruse kontsentreerimine, tootmistingimuste optimeerimine

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Concentration of eGFP-expressing Rhinovirus A16 and Optimization of the Virus Production Conditions in the HeLa Cell Line

Human rhinoviruses are small single-stranded RNA viruses that can cause a variety of health problems including upper respiratory tract illnesses. In addition, rhinoviruses are associated with lower respiratory tract complications, such as bronchitis, pneumonia, and exacerbation of asthma. HeLa cells were transfected with viral RNA prior to this work and that resulted with an eGFP-expressing rhinovirus A16. The main goal of the thesis was to create optimized method to produce the concentrated eGFP-expressing rhinovirus A16. The results presented in this thesis suggest that ultracentrifugation is an effective method for concentrating eGFP-expressing rhinovirus A16 and the most optimal time point for collecting the virus from HeLa cells is 72 hours after infecting the cells.

Keywords: rhinovirus, eGFP-expressing rhinovirus, concentration of rhinovirus, optimization of the conditions for viral production

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

KASUTATUD LÜHENDID

BSA – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumin*)

CDHR3 – inimese kadheriini valguperekonda kuuluv liige 3 (*human cadherin-related family member 3*)

CI – usaldusvahemik (*confidence interval*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool dihidrokloriid (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)

FBS – veise loote seerum (*fetal bovine serum*)

EDTA – etüleendiamiintetraetaanhape (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

eGFP – võimendatult roheliselt fluorestseeruv valk (*enhanced green fluorescent protein*)

ICAM-1 – rakkudevaheline adhesioonimolekul 1 (*intercellular adhesion molecule 1*)

IRES – sisemine ribosoomi sisenemiskoht (*internal ribosome entry site*)

LDLR – madala tihedusega lipoproteiini retseptor (*low-density lipoprotein receptor*)

LRP – LDLR-sarnane valk (*LDLR-related protein*)

MHC – koesobivuskompleks (*major histocompatibility complex*)

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*)

PHL – falloidiin (*phalloidin*)

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

RV – rinoviirus (*rhinovirus*)

TCID50 – 50% rakukultuuri nakatav doos (*tissue culture infectious dose 50%*)

UTR – transleerimata piirkond (*untranslated region*)

VLDLR – väga madala tihedusega lipoproteiini retseptor (*very low-density lipoprotein receptor*)

VP – viiruse valk (*viral protein*)

VPg – genoomiga seotud viiruse valk (*viral protein genome-linked*)

SISSEJUHATUS

Inimese rinoviirused on väikesed positiivse polaarsusega üheaheelised RNA viirused, mis klassifitseeritakse kolme liiki – rinoviirus A, B ja C. Rinoviirus isoleeriti esmakordselt 1956. aastal Dr. Winston Price *et al.* poolt. Rinoviiruse kapsiid, kuhu on pakitud RNA genoom, on ikosaeedrilise kujuga ning sel puudub lipiidne ümbris. Viiruse genoomselt RNA-lt, mille pikkuseks on umbes 7200 alust, transleeritakse üks polüproteiin, mis proteolüüsi tagajärjel lõigatakse struktuurseteks ehk kapsiidivalkudeks ning mittestruktuurseteks valkudeks (Turner, 2009).

Rinoviirused on ühed peamised ülemiste hingamisteede nakkushaiguste põhjustajad. Viirusinfektsiooni sümptomiteks on tavaliselt ninakinnisus, aevastamine, valus kurk ja köha. Rinoviiruseid on hiljuti kirjeldatud ka tõsisemate hingamisteede komplikatsioonide põhjustajatena. Komplikatsioonide hulka kuuluvad näiteks bronhiit, bronhioliit ja kopsupõletik ning astma sümptomite ägenemine rinoviiruse infektsiooni ajal (Gern, 2010).

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates antakse ülevaade inimese rinoviiruste klassifikatsioonist, ehitusest, viirusinfektsiooni kulust ning rinoviiruste poolt põhjustatavatest terviseprobleemidest. Kirjeldatakse ka töös kasutatavat eGFP valku ekspresseerivat rinoviirust A16 ning selle cDNA kloonide valmistamist. Eksperimentaalses osas kontsentreeritakse eGFP-ekspresseerivat rinoviirust A16, optimeeritakse viiruse tootmistingimusi, analüüsides nakatunud rakke läbivoolutsütomeetriaal, ning visualiseeritakse eGFP-ekspresseerivat viirust inimese emakakaelavähi rakkudes (HeLa).

Bakalaureuse töö on valminud Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi geenitehnoloogia õppekava raames, eksperimentaalne osa on läbi viidud Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudis RNA bioloogia uurimisgrupis.

Märksõnad: rinoviirus, eGFP-ekspresseeriv rinoviirus, rinoviiruse kontsentreerimine, tootmistingimuste optimeerimine

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Rinoviiruste klassifikatsioon

Inimese rinoviirused (RV - *rhinovirus*) kuuluvad *Picornaviridae* sugukonda ning *Enterovirus* perekonda ja neid klassifitseeritakse fülogeneetilise järjestuse ning genoomsete omaduste alusel kolme liiki – rinoviirus A, B ja C. Iga rinoviiruse liik sisaldab tüvesid, mida nimetatakse serotüüpideks ehk liigisisesteks variatsioonideks ja neid eristatakse antigeensete omaduste põhjal. Rinoviirus isoleeriti esmakordselt Price *et al.* poolt 1956. aastal ning 1987. aastaks oli tuvastatud juba 100 erinevat rinoviiruse tüve, mis jagati viiruse kapsiidivalke kodeerivate geenide, genoomi mittekodeerivate regioonide ning mõnede täisgenoomide alusel kahte liiki: rinoviirus A ja rinoviirus B (Hamparian *et al.*, 1987; Palmenberg *et al.*, 2010; Jacobs *et al.*, 2013).

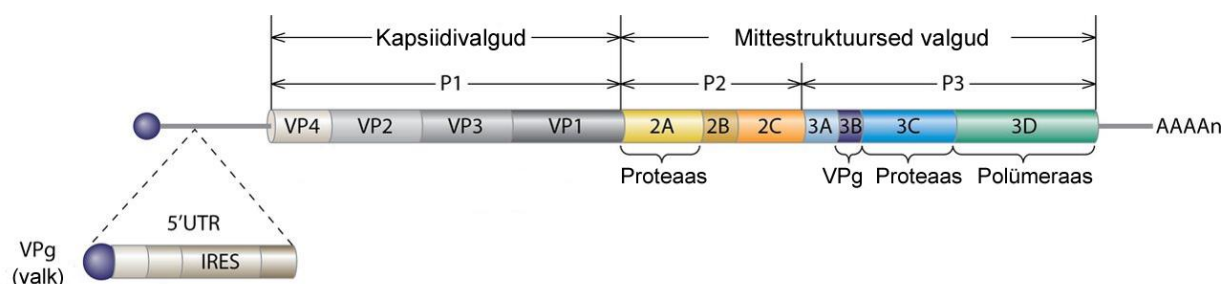
Suur muutus rinoviiruste tuvastamisel toimus 2005. aastal, mil töötati välja kõrge tundlikkusega meetod MassTag polümeraasi ahelreaktsioon (MassTag-PCR – MassTag *polymerase chain reaction*), et tuvastada kliinilistest proovidest patogeene. MassTag-PCR erinevus võrreldes tavalise PCR-ga on tähistatud praimerite kasutamine ning vastava primeri sihtmärgi olemasolul amplifitseeritakse see *multiplex* pöördtranskriptsioon-PCR-ga ning tulemusi analüüsitakse massispektromeetria abil (Briese *et al.*, 2005). Tänu sellele meetodile kinnitati 2006. aastal uue rinoviiruse liigi olemasolu – rinoviirus C. Uue liigi hilise avastuse põhjuseks oli asjaolu, et rinoviirus C tüved ei kasva levinud rakukultuurides (Lamson *et al.*, 2006; Bochkov ja Gern, 2012).

Hetkel on kasutusel geneetiline klassifikatsioon, mille alusel on rinoviirus A jaotatud 85, B 32 ja C 55 serotüübiks. Tüvede määramiseks kas RV A, B või C liiki peab ta omama vähemalt 70% aminohappelise järjestuse sarnasust polüproteiini P1, 2C ja 3CD regioonides (joonis 1) teiste liigikaaslastega (Palmenberg ja Gern, 2015). Selleks, et määrata uus serotüüp, on vajalik vähemalt 12-13% nukleotiidide erinevus viiruse valk 1 (VP1 – *viral protein 1*) geeni regioonis ja/või vähemalt 9,5-10,5% erinevus VP4/VP2 geenide regioonis (Simmonds *et al.*, 2010; Bochkov ja Gern, 2012; McIntyre *et al.*, 2013).

1.2. Rinoviiruse ehitus

1.2.1 Genoom

Inimese rinoviirus on positiivse polaarsusega üheaahelaline RNA viirus, mille genoomi (joonis 1) pikkuseks on umbes 7200 alust (Turner, 2009). RNA ahela 5' ots on kovalentselt seotud VPg (viral protein genome-linked) valguga, mille ülesandeks on käituda genoomi replikatsioonil praimerina (Paul *et al.*, 1998; Turner, 2009; Palmenberg *et al.*, 2010). Sellele järgneb ebatavaliselt pikk mittetransleeritavate järjestuste piirkond (UTR – *untranslated region*), enamasti 600 – 750 alust, mis sisaldab translatsiooniks vajalikke elemente, näiteks sisemist ribosoomi sisenemiskohta (IRES – *internal ribosome entry site*), mille abil algatatakse translatsioon (Brown *et al.*, 2005; Palmenberg *et al.*, 2010). Genoomi 3' otsas paikneb umbes 50 nukleotiidi pikkune UTR järjestus, mis algab avatud lugemisraami terminatsiooni koodoniga ning sellele järgneb polü(A)-saba, millel arvatakse olevat oluline roll viiruse negatiivse RNA ahela sünteesi algatamises (Brown *et al.*, 2005; Palmenberg *et al.*, 2009; Racaniello, 2013).

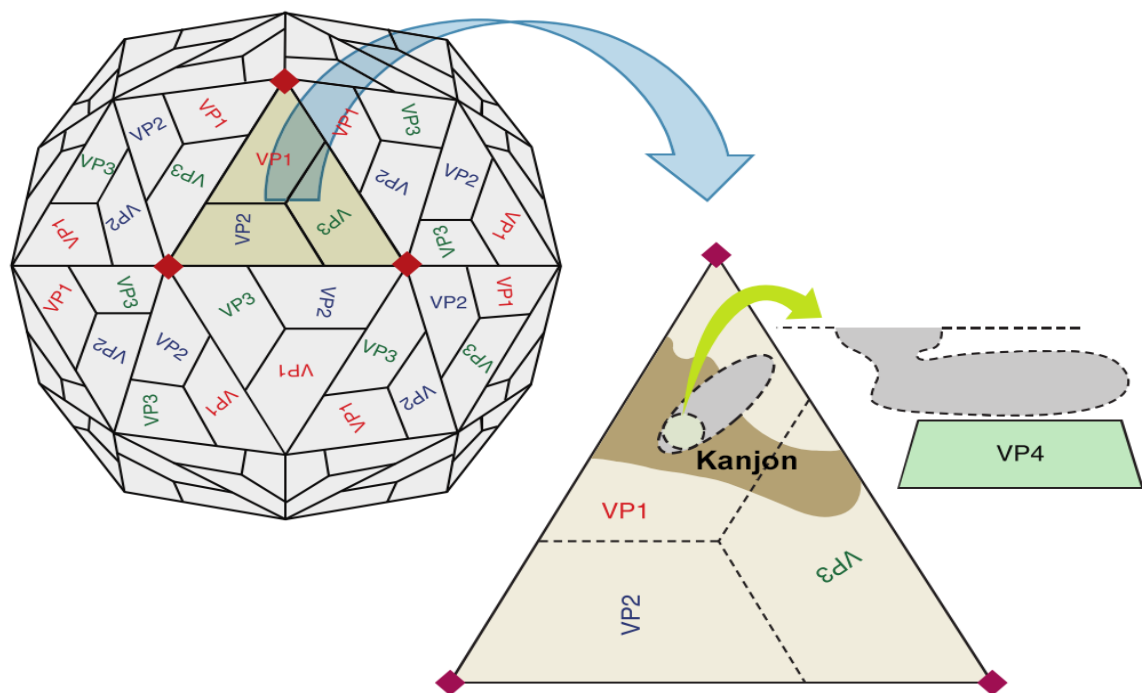


Joonis 1. Rinoviiruse genoomi struktuur. Rinoviiruse genoomi pikkuseks on umbes 7200 alust. RNA ahela 5' ots on kovalentselt seotud VPg valguga. Sellele järgneb 5' UTR järjestus, mis sisaldab IRES elementi. Genoomis on üks avatud lugemisraam, mille translatsiooni tulemusena saadakse üks polüproteiin, mis on jaotatud kolmeks regiooniks: P1, P2 ja P3. Ahela 3' otsas paikneb polü(A)-saba. Modifitseeritud Jacobs *et al.*, 2013 järgi.

Viiruse genoomis on üks avatud lugemisraam, mis esindab umbes 91% kogu viiruse genoomist ning mille translatsiooni tulemusena saadakse üks polüproteiin, mis sisaldab umbes 2200 aminohapet. Avatud lugemisraam on jaotatud proteolüütilise töötlemise alusel kolmeks suureks regiooniks: P1, P2 ja P3, mis kujutavad endast valkude prekursoreid (joonis 1). Valk P1 on prekursor neljale kapsiidivalgule VP1, VP2, VP3 ja VP4. P2 ja P3 on prekursorid proteaasidele 2A ja 3C, mis on olulised polüproteiini töötlemisel, ning valkudele, mis on vajalikud viiruse paljunemiseks rakus (Lin *et al.*, 2009; Turner, 2009).

1.2.2 Virioon

Virioon on peremeesrakust väljaspool olev viirusosake, mis koosneb nukleiinhappest ja valgulisest kapsiidist ning mõnedel viirustel ka kapsiidi katvast membraanist (Katpally ja Smith, 2007). Rinoviiruse kapsiid, mida on kujutatud joonisel 2, on ikosaeedrilise kujuga, diameetriga umbes 30 nm, sel puudub lipiidne ümbris ja kapsiidi keskele on tihedalt pakitud üheaheelaline RNA (Turner, 2009). Kapsiidi moodustavad neli valku: VP1, VP2, VP3 ja VP4, mis moodustavad 60 protomeeri ehk struktuurse valgu üksust. Valgud VP1, VP2 ja VP3 paiknevad protomeeri pinnal, moodustades kapsiidi välimise kihi ning vastutades viiruse antigeense mitmekesisuse eest. Neljas ning väikseim kapsiidivalk VP4 aga paikneb kapsiidi sisepinnal ning käitub ühenduslülina RNA ja teiste kapsiidivalkude vahel. Protomeeridest moodustatakse 12 pentameeri, mis seatakse kokku viriooni kapsiidiks (Wang ja Smith, 2005; Jacobs *et al.*, 2013).



Joonis 2. Rinoviiruse kapsiidi struktuur. Rinoviiruse kapsiid on ikosaeedrilise kujuga ning sel puudub lipiidne ümbris. Kapsiidivalkudest moodustatakse 60 protomeeri. Kapsiidi välimine kiht moodustatakse protomeeri pinnal paiknevatest VP1, VP2 ja VP3 valkudest. VP1 valgus paikneb süvend ehk kanjon, mida peetakse ICAM-1 retseptori seondumiskohaks. Neljas ning väikseim kapsiidivalk VP4 paikneb kapsiidi sisepinnal ning käitub ühenduslülina RNA ja teiste kapsiidivalkude vahel. Modifitseeritud Kennedy *et al.*, 2012 järgi.

1.3. Viirusinfektsioon

1.3.1. Rakureseptorid

Viirusinfektsiooni esimene etapp on viriooni seundumine spetsiifilistele peremeesraku retseptoritele, mille abil initsieeritakse viirusnakkuse algus (Helenius, 2013). Rinoviiruse serotüübid jagatakse raku retseptori spetsiifilisuse alusel kolme gruppi – „suurem“ (*major*), „väiksem“ (*minor*) ning RV-C. „Suurema“ grupi, kuhu kuuluvad enamik RV-A ning kõik RV-B serotüübid, rinoviirused seonduvad peremeesrakule rakkudevahelise adhesioonimolekuliga 1 (ICAM-1 – *intercellular adhesion molecule 1*). ICAM-1 kuulub immunoglobuliini superperekonda ning omab suurt rolli adhesiooni tekkimisel rakkude vahel või ekstratsellulaarses maatriksis olevate molekulidega (Greve *et al.*, 1989; van de Stolpe ja van der Saag, 1996). „Suurem“ RV grupp on kõrge spetsiifilisusega ja nende seundumine toimub peale inimese veel vaid šimpansi ICAM-1 molekuliga (Bella ja Rossmann, 1999; Gern ja Palmenberg, 2013).

„Väiksema“ grupi, kuhu kuulub 12 rinoviiruse A serotüüpi, rinoviirused seonduvad madala tihedusega lipoproteiini retseptoriga (LDLR – *low-density lipoprotein receptor*), väga madala tihedusega lipoproteiini retseptoriga (VLDLR – *very low-density lipoprotein receptor*) või LDLR-sarnase valguga (LRP – *LDLR-related protein*) (Hofer *et al.*, 1994; Reithmayer *et al.*, 2002; Bochkov ja Gern, 2016). LDLR on endotsütootiline retseptor, mille ülesandeks on vahendada kolesteroolirikaste lipoproteiinide transpordi rakku (Nykjaer ja Willnow, 2002). „Väiksemasse“ grupi kuuluvatel rinoviirustel on kirjeldatud retseptoriga seundumist lisaks inimesele ka näiteks hiirtel (Reithmayer *et al.*, 2002).

Rinoviirus C tüved erinevad retseptori spetsiifilisuse poolest teistest rinoviirustest. Lisaks liigi hilisele avastamisele oli kuni 2015. aastani teadmata, mis retseptor vahendab rinoviirus C sisenemist peremeesrakku. Bochkov *et al.* tuvastasid, et selleks on inimese kadheriini valguperekonda kuuluv liige 3 (CDHR3 – *human cadherin-related family member 3*). CDHR3 bioloogiline funktsioon ei ole teada, ent see kuulub kadheriini perekonna transmembraansete glükoproteiinide hulka, mis on seotud rakkude adhesiooni, rakk-rakk interaktsioonide ja diferentseerumisega (Hulpiau ja van Roy, 2009; Bochkov ja Gern, 2016).

1.3.2. Viiruse sisenemine rakku

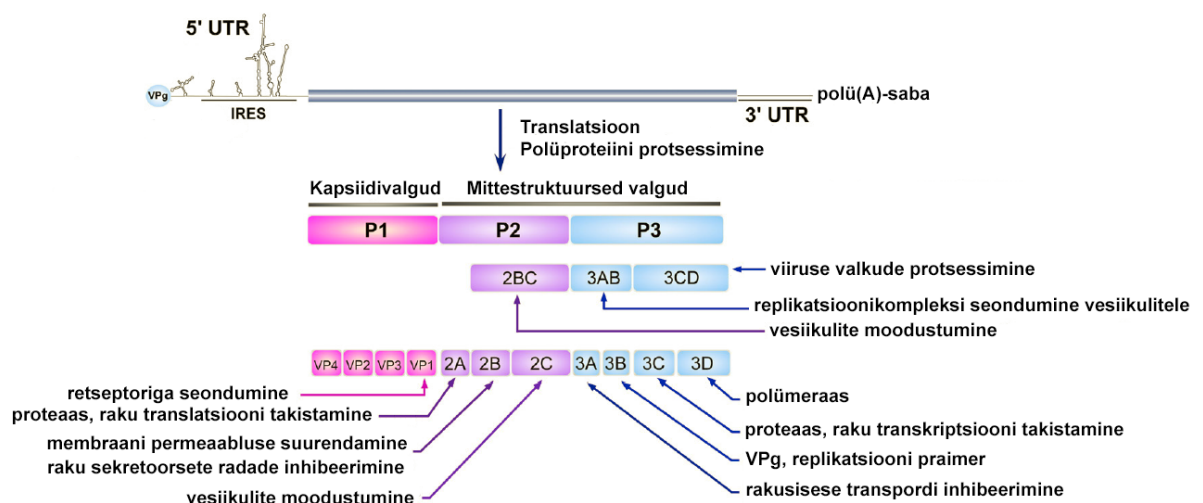
Rinoviiruse infektsioon algab viriooni kinnitumisega spetsiifilisele retseptorile raku plasmamembraanil (Turner, 2009). Viriooni seondumiskoht asub nii „suuremal“ kui ka „väiksemal“ grupil viiruskapsiidi pentameeri keskkoha läheduses. ICAM-1 korral on seondumissaidiks VP1 valgus paiknev kanjon (joonis 2), mis ümbritseb pentameeri keskkoha ning kujutab endast umbes 2 nm sügavust ning 1,5 – 3,5 nm laiust süvendit viriooni kapsiidis (Colonna *et al.*, 1988; Kolatkar *et al.*, 1999). LDLR retseptori seondumiskohaks on tähekujuline struktuur pentameeri tipus (Hewat *et al.*, 2000). Rinoviirus C retseptori seondumiskoht viriooni kapsiidis ei ole veel teada.

Rinoviiruste rakku sisenemise mehhanismid erinevad sõltuvalt retseptori tüübist. Kui „suurema“ ja „väiksema“ grupi serotüüpide rakku sisenemise mehhanisme on palju uuritud ning need suures osas kirjeldatud, siis rinoviirus C puhul on need molekulaarsed mehhanismid veel teadmata (Bochkov ja Gern, 2016). „Suurema“ grupi rinoviirused saavad siseneda rakkudesse läbi klatriin- või dünamiin-sõltuva retseptor-vahendatud endotsütoosi. „Väiksema“ grupi rinoviirused teevad seda klatriin-sõltuva retseptor-vahendatud endotsütoosi teel, ent kui see rada on mingil põhjusel blokeeritud, toimub sisenemine klatriin- ja dünamiin-sõltumatu raja kaudu (Grunert *et al.*, 1997; Bayer *et al.*, 2001; Snyers *et al.*, 2003). Rakku sisenenud, toimub endosoomides RV virioonil konformatsioonimuutus, mille tagajärjel vabaneb RNA molekul kapsiidist. „Suurema“ grupi rinoviirustel algatab selle protsessi ICAM-1 ning madal pH endosoomides, „väiksema“ grupi liikmetel retseptor protsessist osa ei võta. Viiruse RNA difundeerub tsütosooli läbi endosoomi membraani kas viiruste kapsiidivalkude poolt moodustatud pooride või augustunud membraani kaudu (Fuchs ja Blaas, 2010).

1.3.3. Viiruse translatsioon ja replikatsioon

Viiruse infektsioonitsükkel jätkub viiruse RNA translatsiooni ja replikatsiooniga, mille käigus kasutatakse nakatunud rakku uute virioonide tootmiseks. Esmalt peab toimuma translatsioon, kuna replikatsioon ei saa alata ilma selleks vajalike viirusvalkudeta (Turner, 2009). Translatsioon algab 5' UTR regioonis paikneva IRES elemendi seondumisega raku ribosoomile. Sünteesitakse üks polüproteiin, mis lõigatakse viiruse proteaaside abil struktuurseteks ehk kapsiidivalkudeks ja mittestruktuurseteks valkudeks (Pestova *et al.*, 1996; Gavala *et al.*, 2012). Valkude ülesanded on välja toodud joonisel 3. Mittestruktuursete valkude ülesandeks on viiruse genoomi translatsiooni ja replikatsiooni toimumise tagamine – näiteks

membraanide ümberpaigutamine ja läbilaskvuse suurendamine, tuumatranspordi kontrollimine ning peremeesraku transkriptsiooni ja translatsiooni takistamine. Lisaks on vaja tagada, et tsütotoksilised T-rakud ei tunneks viirusega nakatunud rakku ära. Selleks toimub koosobivuskompleksi (MHC – *major histocompatibility complex*) klass I molekulide ekspressiooni mahasurumine (Cornell ja Semler, 2006; Racaniello, 2013). Mittestruktuursete valkude hulka kuuluvad ka RNA-sõltuv RNA polümeraas ning replikatsioonil praimerina käituv VPg valk (Hung *et al.*, 2002; Turner, 2009). Pärast esmast translatsiooni ning raku toimunud ümberkorraldusi saab replikatsioon alata.



Joonis 3. Rinoviiruse genoomi struktuur koos polüproteiini produktide ja nende peamiste funktsioonidega. Polüproteiin koosneb kolmest regioonist: P1, P2 ja P3. P1 on prekursoriks kapsiidivalkudele, P2 ja P3 proteaasidele ning valkudele, mis on vajalikud viiruse paljunemiseks raku. Polüproteiin lõigatakse üheteistkümneks valguks, mille peamised funktsioonid on lisatud joonisele. Välja on toodud ka prekursorite 2BC, 3AB ja 3CD peamised funktsioonid. Modifitseeritud Lin *et al.*, 2009 järgi.

Replikatsioon, mis toimub viirusvalkude poolt indutseeritud vesiikulites, algab genoomsele RNA-le komplementaarse negatiivse RNA ahela sünteesiga, mis on seejärel omakorda aluseks uute positiivsete ahelate sünteesil. Replikatsiooniga paralleelselt toimub positiivsetelt ahelatelt translatsioon, et suurendada kapsiidivalkude hulka raku. Kui kapsiidivalke on piisavas koguses, alustatakse kapsiidide moodustamisega (Racaniello, 2013). Selleks peab toimuma kapsiidivalkude prekursori P1 lõikamine, et moodustada varajased protomeerid kolmest tihedalt agregeerunud valgust VP0, VP1 ja VP3 (Arnold *et al.*, 1987). Varajased protomeerid pannakse kokku pentameerideks, mis pakivad sisse viiruse genoomi, moodustades proviriooni

(Jacobson ja Baltimore, 1968). Seejärel toimub VP0 molekuli lõikamine valkudeks VP2 ja VP4 ning saadakse nakkusvõimelised virioonid (Palmenberg, 1982; Lee *et al.*, 1993). Virioonid vabanevad peremeesrakust infektsioon-vahendatud lüüsumise tagajärjel ning on valmis nakatama uusi rakke (Turner, 2009).

1.4. Rinoviiruste poolt põhjustatavad terviseprobleemid

Rinoviirused on ühed peamised ülemiste hingamisteede nakkushaiguste põhjustajad (Mäkelä *et al.*, 1998). Viirusinfektsioon algab tavaliselt viiruse sattumisega ninna või silma, kuhu viirusosake võib jõuda läbi otsese kontakti või köhimisel ja aevastamisel vabanevate piiskade tõttu. Otsene kontakt toimub näiteks nina või silma hõõrumisel viirusega saastunud sõrmega, millele viirus võib sattuda keskkonnast või teistelt inimestelt (Hendley *et al.*, 1973; Reed, 1975; Jennings ja Dick, 1987; Hendley ja Gwaltney, 1988).

Viirusinfektsiooni sümptomiteks on tavaliselt ninakinnisus, aevastamine, valus kurk ja köha. Sõltumata sümptomite leebusest on külmetusse haigestumine siiski ühiskonnale koormaks arstide külastamise, ravimite ostmise ning töölt või koolist puudumise näol (Fendrick *et al.*, 2003; Gern, 2010). Külmetushaiguste sageduse tõttu on rinoviiruseid läbi aegade seostatud just eelkõige ülemiste hingamisteede nakkushaiguste põhjustajatena. Nüüdseks on avastatud, et teatud inimrühmadel on suurem risk rinoviiruse infektsiooni poolt põhjustatud alumiste hingamisteede komplikatsioonide tekkeks. Nendesse kõrge riskiga inimrühmadesse kuuluvad näiteks imikud, vanurid, suitsetajad ja inimesed, kes kannatavad astma või tsüstilise fibroosi käes. Komplikatsioonideks võivad olla näiteks astma ägenemine, vilistav hingamine, bronhiiti, bronhioliiti või kopsupõletikku haigestumine (Gern ja Busse, 1999; Gern, 2010). Nendest üks enimuuritud on astma ägenemise ja rinoviirusinfektsiooni vaheline seos.

Astma on levinud krooniline haigus, mõjutades üle 300 miljoni inimese üle maailma (Lambrecht ja Hammad, 2014). Astmat iseloomustavad hingamisraskused, hingamisteede ülitundlikkus ja põletik ning nendega kaasnevad õhupuudus, köha, vilistav hingamine ja raskustunne rinnus (Dougherty ja Fahy, 2009). Astma vältel võib toimuda sümptomite ägenemine, halvimal juhul tekivad tõsised hingamisraskused ning on vajalik arstide sekkumine, seda eriti laste puhul (Johnston *et al.*, 1996; Dougherty ja Fahy, 2009). Rinoviirus tuvastati 60–90% lastel ja 50–80% täiskasvanutel, kes vajasisid astma ägenemise tõttu haiglaravi (Nicholson *et al.*, 1993; Johnston *et al.*, 1995; Busse ja Gern, 1997; Gern ja Busse, 1999). Astma ägenemise üheks põhjuseks peetakse viirusinfektsiooni mõju limaskestale ning selle vastu

tekkivat immuunreaktsiooni, mistõttu juba olemasolev astmast tingitud põletik süveneb veelgi ning soodustab sümptomite intensiivistumist (Gern ja Busse, 1999).

Kuigi rinoviirused avastati juba 60 aastat tagasi, on siiani võimalik rinoviiruse infektsiooniga kaasnevaid sümptomeid vaid leevendada, mitte ennetada või ravida viirusinfektsiooni ennast. Rinoviirusnakkuste ennetamiseks on püütud välja töötada vaktsiine, ent lai antigeenne mitmekesisus rinoviiruste seas on saanud efektiivsete vaktsiinide turule toomise peamiseks takistuseks (Glanville ja Johnston, 2015). Lisaks vaktsiinidele on proovitud leida erinevaid viise rinoviirusnakkuste ravimiseks, ent siiani pole õnnestunud neid efektiivsete ravimitena realiseerida (Andries *et al.*, 1990; Hayden *et al.*, 2003; Gern ja Palmenberg, 2013). Näiteks avastati, et interferoon- α omab antiviraalseid omadusi *in vitro* tingimustes ning lühendab viirusinfektsiooni ning alandab sümptomite ägedust, ent kahjuks kaasnes vabatahtlikel selle kasutamisega ärritus ning verejooks ninas (Hayden *et al.*, 1986). On kirjeldatud ka, et tsingi imemistabletid lühendavad külmetushaiguste kestvust, ent kõrvaltoimetena esineb halb maitse suus ning iiveldus (Singh ja Das, 2012). Erinevate ravimite valmistamise ning turule toomise ebaõnnestumise põhjusteks on enamasti liiga kõrge hind, toksilisus, kõrvaltoimed või vähene efektiivsus (Turner, 2005; Gern, 2010).

1.5. Rinoviirus A16

Rinoviirus 16 kuulub nii A liigi serotüüpi kui ka „suuremasse“ rinoviiruste gruppi, mis kasutavad rakku sisenemiseks retseptorina ICAM-1 molekuli. Rinoviirus 16 abil on uuritud rinoviiruste levikut, külmetushaiguste patogeneesi, astma sümptomite ägenemist ja rinoviiruste vastaste ravimite toimet (Bush *et al.*, 1978; Lemanske *et al.*, 1989; Calhoun *et al.*, 1994; Grünberg *et al.*, 1999). Teda on kasutatud laialdaselt ka hingamisteede viirusinfektsiooni tagajärjel tekkiva põletiku süvenemise molekulaarsete mehhanismide uurimiseks (Gern ja Busse, 1999; Gavala *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2014; Heymann, 2015). Rinoviirus A16 sagedase kasutuse põhjusteks uuringutes on tema võime koekultuuris väga edukalt paljuneda ning uuringutes vabatahtlikel järjepidevalt sümptomeid tekitada (Lee *et al.*, 1995; Lee ja Wang, 2003).

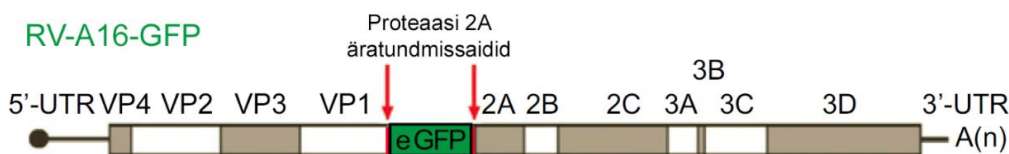
1.5.1. Rinoviirus A16-eGFP konstrueerimine

Viirusinfektsioonide lihtsamaks jälgimiseks on kasutatud erinevaid meetodeid viiruste visualiseerimiseks. Wisconsinis ülikoolis, Prof. James E. Gerni laboris valmistati rinoviirus A16

võimendatud roheliselt fluorestseeruvat valku (eGFP – *enhanced green fluorescent protein*) ekspresseeriv konstrukt. eGFP on roheliselt fluorestseeruva valgu võimendatud vorm, millel on suurem fotostabiilsus ning fluorestsentsi intensiivsus võrreldes metsiktüüpi GFP-ga. Selle abil on võimalik iseloomustada näiteks rakkude nakatumist viirusega eGFP signaali olemasolu ja tugevuse järgi.

Konstrukti valmistamise esimeseks sammuks oli RV A16 kaheaahelalise cDNA kloon valmistamine. Lee *et al.* kirjeldasid 1993. aastal RV B14 kaheaahelalise cDNA kloon tegemise meetodit, mille järgi on valmistatud ka RV-A16 cDNA kloon. Lee *et al.* meetod põhineb Gubler'i ja Hoffman'i poolt 1983. aastal avaldatud artikli põhjal. Rinoviiruse esimene cDNA ahel sünteesiti viiruse genoomse RNA põhjal lindude müeloblastoosi viirusest saadud pöördtranskriptaasi abil. cDNA teise ahela süntees toimus *Escherichia coli* DNA polümeraas I abil (Gubler ja Hoffman, 1983; Lee *et al.*, 1993). Seejärel sisestati cDNA kaheaahelaline järjestus pMJ3 plasmidi vektorisse ning kohe faagi T7 RNA polümeraasi promootori järele. Tulemusena saadi rinoviirus A16 genoomset järjestust kandev cDNA kloon pR16.11. T7 rinoviirus A16 genoomi transkriptidel on ahela 5' otsas kaks lisanukleotiidi (GG), ent varasemalt on näidatud, et kahel lisanukleotiidil on minimaalne efekt rinoviiruse infektsioonivõimele. (Lee *et al.*, 1993; Lee ja Wang, 2003).

Bochkov *et al.* kirjeldasid 2015. aastal rinoviirus C15-eGFP cDNA kloon valmistamist ning samal meetodil on tehtud ka rinoviirus A16-eGFP cDNA kloon. Esmalt amplifitseeriti eGFP ja RV-A16 proteaasi 2A liitvalgu järjestus kaheetapilise PCR-ga. Selle tulemusena saadud 1116 aluspaariline amplikon kloneeriti pR16.11 plasmidi, saades pA16-eGFP plasmidi. eGFP järjestus sisestati VP1 ja 2A proteaasi geenide vahele ning see külgnes kahe proteaasi 2A poolt äratuntava saidiga. eGFP järjestuse paiknemine on välja toodud joonisel 4. eGFP molekul vabaneb viirusinfektsioonil polüproteiinist translatsioonijärgselt (Bochkov *et al.*, 2015).



Joonis 4. Rinoviirus A16 eGFP valku ekspresseeriva viiruse genoomi struktuur. eGFP järjestus on sisestatud rinoviirus A16 genoomi VP1 valku ning 2A proteaasi kodeerivate geenide vahele. eGFP külgneb kahe 2A proteaasi poolt äratuntava saidiga. Viiruse genoomse RNA translatsiooni järgselt vabaneb eGFP valk polüproteiinist proteaasse aktiivsuse tagajärjel. Modifitseeritud Bochkov *et al.*, 2015 järgi.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud bakalaureuse tööle eelnevalt transfecteeriti HeLa rakke pA16-eGFP plasmiidist sünteesitud viirusliku RNA-ga ning selle tulemusel saadi nakkusvõimeline eGFP-ekspresseeriv rinoviirus A16. Transfecteerimise teostas Alar Aab. Antud töös püstitati peamiseks eesmärgideks:

1. eGFP-ekspresseeriva rinoviirus A16 kontsentreerimine;
2. eGFP-ekspresseeriva rinoviirus A16 tootmistingimuste optimeerimine.

Töögrupis planeeritavate eksperimentide hulka kuulub ka rinoviirus A16-eGFP replikatsioonitsentrite visualiseerimine, mille tõttu püstitati järgmine lisaeesmärk:

3. eGFP-ekspresseeriva rinoviirus A16 visualiseerimine HeLa rakkudes.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud rakuliinid ja söötmed

Eksperimentides kasutati HeLa rakuliini (inimese emakakaelavähi rakuliin). Kõikides katsetes kasutati RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) söödet L-glutamiini ja naatriumvesinikkarbonaadiga (Sigma-Aldrich, USA), millele oli lisatud 10% veise loote seerumit (FBS – *fetal bovine serum*) (PAA, USA) ning 100 IU/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (Lonza, Šveits). Rakke kasvatati koekultuuri-inkubaatoris küllastunud veeauru ja 5% CO₂ keskkonnas ning temperatuuril 37 °C. Rakke külvati ümber iga kahe kuni kolme päeva järel. Rakkude eemaldamiseks koekultuuri pudeli põhjast kasutati trüpsiin-EDTA lahust (trüpsiin-EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*): 0,05% trüpsiini ja 0,02% EDTA-d) (GE Healthcare, UK).

2.2.2. Kasutatud viirus

Eksperimentides kasutatava viiruse saamiseks kasutati pA16-eGFP plasmidi, mis on inimese rinoviirus A16 cDNA kloon, millele on lisatud eGFP valku kodeeriv järjestus VP1 valgu ja 2A proteaasi geenide vahele. pA16-eGFP plasmid oli kingitus Yuri A. Bochkovilt ja James E. Gernilt Wisconsin Ülikoolist (USA). HeLa rakke transfecteeriti pA16-eGFP plasmidist sünteesitud viirusliku RNA-ga ning selle tulemusel saadi nakkusvõimeline eGFP-ekspresseeriv rinoviirus A16. Transfecteerimise teostas Alar Aab. Katsetes kasutati viiruslahuseid tiitriga $3,17 \times 10^1$ või $3,81 \times 10^3$ TCID₅₀/ml ning ultratsentrifuugitud viiruslahust, mille tiiter ei ole teada.

2.2.3. Rakkude nakatamine rinoviirus A16-eGFP-ga

Rakkude nakatamiseks viirusega lisati söötmesse viiruslahust. Lisatav kogus sõltus eksperimentidest ning need on toodud välja tabelis 1. Lisatud on ka vastavate viiruste 50% rakukultuuri nakatava doosi (TCID - *tissue culture infectious dose*) tiitri väärtus milliliitri kohta, mida eksperimentides kasutati. HeLa rakkude viirusega nakatamiseks loksutati vastavaid koekultuuri pudeleid või plaate rakkudele lisatud viiruslahusega madalal kiirusel tund aega toatemperatuuril.

Tabel 1. Eksperimentides rakkude nakatamiseks kasutatava viiruslahuse kogus ning vastav tiitri väärtus.

| Eksperiment | Nakatamiseks lisatav viiruslahus (µl) | Kasutatava viiruse tiiter (TCID₅₀/ml) |
|---------------------------|--|---|
| Viiruse paljundamine | 200 | $3,17 \times 10^1 / 3,81 \times 10^3$ |
| Läbivoolutsütomeetria | 70 | $3,81 \times 10^3$ |
| Fluorestsentsmikroskoopia | 25 | $3,17 \times 10^1 / 3,81 \times 10^3$ |
| Viiruse tiitrimine | Sõltuvalt lahjendusest | $3,17 \times 10^1 / 3,81 \times 10^3$ |

2.2.4. Viiruse kontsentreerimine

2.2.4.1. Viiruse paljundamine ning säilitamine

Viiruse paljundamiseks kasutati 150 cm² koekultuuri pudeleid, kus HeLa rakud kasvatati 60% konfluentseks ning nakatati RV A16-eGFP viirusega. 72 h möödudes külmutati pudelid koos rakkude ja söötmega -80 °C-ni, seejärel sulatati +4 °C-ni ning korrati külmutamist-sulatamist veel kaks korda. Seejärel tsentrifuugiti söötme ja rakkude segu 1000 g juures 15 minutit ning supernatant tõsteti puhtasse tuubi. Viiruse säilitamiseks jagati supernatant 2 ml tuubidesse ning säilitati -80 °C juures.

2.2.4.2. Ultratsentrifuugimine

Ultratsentrifuugimise jaoks paljundati kontsentreerimata viirust, mis toimus peatükis 2.2.4.1. kirjeldatud meetodi abil. Viiruse paljundamise järgselt saadud supernatanti kasutati ultratsentrifuugimisel viiruse kontsentreerimiseks. Eksperimendis kasutati Beckman L7 ultratsentrifuugi ning SW 41 Ti rootorit (Beckman Coulter, USA). *Ultra-clear* tsentrifuugi tuubid (Thermo Fisher Scientific, USA) täideti supernatandiga, tsentrifuugiti 15 minutit 35 280 g (14 344 rpm) ja 20 °C juures ning selle järgselt tõsteti supernatant puhtasse tuubi. Valmistati ette uued *ultra-clear* tsentrifuugi tuubid, lisades igasse tuubi 1,5 ml 30% sahharoosi lahust PBS-is. Tuubid täideti supernatandiga ning tsentrifuugiti neli tundi 141 118 g (28 688 rpm) ja 20 °C juures. Supernatant ja sahharoosi lahus aspireeriti ettevaatlikult ning sade lahustati 200 µl PBS-is. Proovid säilitati -80 °C juures. Edaspidi kasutatava kontsentreeritud viiruse saamiseks paljundati ultratsentrifuugitud viirust peatükis 2.2.4.1 kirjeldatud meetodi abil.

2.2.5. Viiruse tiitri määramine

Viiruse tiitrimiseks lõpp-punkti meetodil kasutati 96-kannu plaati. Esmalt tehti algse viiruslahusest lahjendusrida, mille käigus tehti kuus järjestikku viiekordset lahjendust. Nii algse viiruslahuse kui iga lahjenduse kohta tehti kaheksa kordust. Igasse kannu lisati 200 µl rakkudega söödet ehk ligikaudu 10 000 rakku kannu kohta. Rakkude loendamiseks kasutati TC20™ automatiseeritud rakkude loendurit (Bio-RAD, USA). Seejärel lisati esimesse ritta 50 µl algset viiruslahust, saades koos kannus oleva söötmega kokku viiekordse viiruslahuse lahjenduse. Teise ritta lisati 50 µl viiekordselt lahjendatud viiruslahust, saades kannu kokku 25-kordse lahjenduse. Nii korrati kuni seitsmenda rea lõpuni, kuhu lisati igasse kannu 50 µl lahjendusrea viimast lahjendust, saades kokku 78 125-kordse lahjenduse. Kaheksas rida oli

kontrolliks ning sinna lisati viiruslahuse asemel 50 µl söödet. Iga kannu lõppmaht oli 250 µl. Katse teostati kontsentreerimata ja kontsentreeritud viiruse jaoks eraldi. Viie päeva pärast kasutati viiruse tiitri määramiseks kahte indikaatorit, tsütopaatiliste efektide esinemist ning söötme värvust. Kui söötme värvus on viie päeva pärast lähedane algsele, antud juhul roosakaspunasele, viitab see viiruse suurele nakatumisvõimele, kuna rakud surevad viiruse tagajärjel ära enne, kui jõuavad söödet piisavalt kaua elutegevuseks kasutada. Tsütopaatilised efektid on viiruslikust infektsioonist põhjustatud struktuursed muutused peremeesrakus, mis toimuvad tavaliselt infektsiooni lõppstaadiumis, mil rakk hakkab surema. Selleks on näiteks rakkude kärbumine (Racaniello, 2013). Algandmed ja tulemused kanti Reed ja Muench'i kalkulaatorisse, mille abil arvutati nii kontsentreeritud kui kontsentreerimata viiruse tiiter.

2.2.6. Rakkude analüüs läbivoolutsütomeetria

Läbivoolutsütomeetrit kasutati, et analüüsida HeLa rakkudes eGFP signaali olemasolu ja tugevust neljas ajapunktis – 24, 48, 72 ja 96 tundi pärast viirusega nakatamist. Külvamine toimus tihedusel 1,25 miljonit rakku (umbes 50% konfluentsusest) ühe 25 cm² koekultuuri pudeli kohta ning nakatati kontsentreeritud viirusega. Vastavas ajapunktis eemaldati rakkudelt sööde, pesti ühe korra PBS-ga ning inkubeeriti trüpsiini-EDTA lahusega 37 °C juures viis minutit. Rakkudega trüpsiinilahus lahjendati PBS-ga ning tsentrifuugiti 250 g ja 20 °C juures seitse minutit. Supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti PBS-is. Proove analüüsiti läbivoolutsütomeetriga BD LSRFortessa (BD Biosciences, USA) ning analüüsiti tarkvaraga FACSDiva, versioon 6.2. Katse viidi läbi kaks korda ning mõlemas katses teostati vähemalt kuus tehnilist kordust, iga korduse kohta salvestati 100 000 sündmust.

2.2.7. Fluorestsentsmikroskoopia

Rakke kasvatati 24-kannu plaatides ning iga kannu põhja oli asetatud 10 mm diameetriga katteklaas. Külvamine toimus tihedusel 100 000 rakku (umbes 50% konfluentsusest) ühe kannu kohta ning rakke nakatati kontsentreeritud viirusega. 48 tunni möödudes sööde aspireeriti ja rakke pesti kolm korda PBS-ga. Kõik eksperimendi järgmised etapid toimusid toatemperatuuril ning nende vahel pesti rakke kolm korda PBS-ga viie minuti jooksul loksutil, kui ei ole kirjeldatud teisiti. Rakke fikseeriti 4% paraformaldehüüdi lahusega PBS-is 10 minutit ning permeabiliseeriti 0,2% Triton X-100-PBS lahuses 10 minutit. Rakke blokeeriti 1% blokeerimislahusega (veise seerumi albumiin PBS-i lahuses) 30 minutit, mille järel pesti rakke ühe korra PBS-ga. Järgmiseks värviti rakke Alexa Fluor® 594 falloidiini (Invitrogen, USA),

edaspidi PHL 594 (PHL – *phalloidin*) 1,5 U/ml lahusega 30 minutit ning pesti taas ühe korra PBS-ga. Viimaks lisati rakkudele DAPI (4',6-diamidino-2-fenüülindool dihidrokloriid (4',6-diamidino-2-phenylindole)) lahus kontsentratsiooniga 0,2 µg/ml (Roche, Šveits) viieks minutit. Klaasid sulundati sulundusseguga (EverBrite Hardset Mounting Medium) (Biotium, USA). Nakatunud rakkude analüüsimiseks valgusmikroskoopia abil jäeti vahele HeLa rakkude permeabiliseerimine, blokeerimine, PHL 594-ga ja DAPI-ga värvimine ning nende etappide vahelised pesud PBS-ga. Kontrollide puhul jäeti ära rakkude nakatamine viirusega, kõik teised etapid tehti sarnaselt mitte-kontrollile. Preparaatide analüüsiks kasutati fluorestsentsmikroskoopi (Olympus BX51, Jaapan).

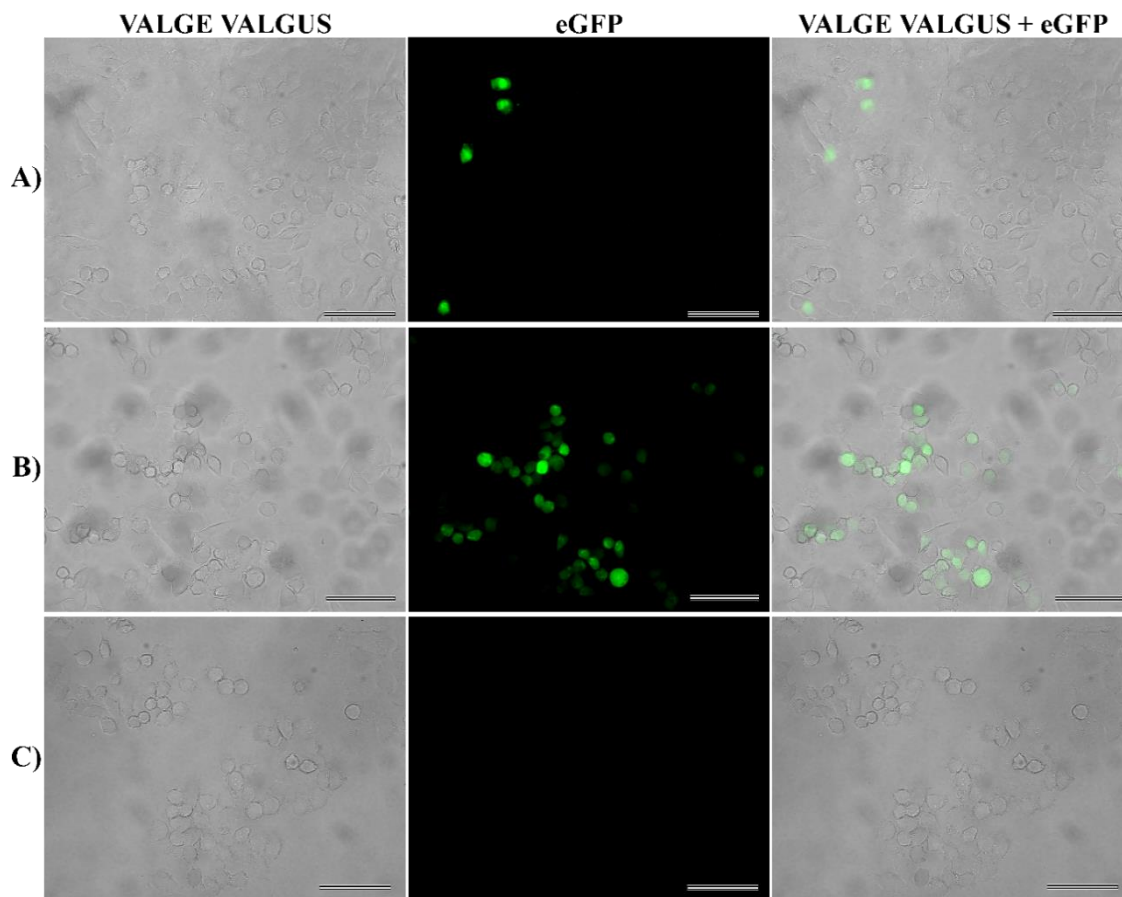
2.2.8. Statistiline analüüs

Läbivoolutsütomeetria andmete analüüsiks ja tulemuste esitamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc, USA). Tulemuste statistilisel analüüsil kasutati sõltumatute valimite keskväärtuste võrdlemiseks mõeldud t-testi (*unpaired t-test*). Graafikul on esitatud tulemuste keskväärtused koos 95% usaldusvahemikuga (CI – *confidence interval*). N joonise allkirjas näitab läbiviidud katsete arvu. Tulemused loeti statistiliselt oluliseks $P < 0,05$ juures. Joonisel kasutatakse järgnevat tähistust: *** $P < 0,001$.

2.3. TULEMUSED

2.3.1. Rinoviiruse kontsentreerimine ning kontsentreerimata ja kontsentreeritud viiruse nakatumisvõime võrdlus

Rinoviiruse kontsentreerimise jaoks paljundati kontsentreerimata viirust ning viiruse paljundamise järgselt saadi viirusega supernatant, mida kasutati viiruse kontsentreerimiseks ultratsentrifuugimis-meetodil. Rinoviiruse nakatamisvõimet hinnati kas viiruslahuse tiitrimisega lõpp-punkti meetodil või visuaalselt valgus- ja fluorestsentsmikroskoopia meetodil (võrreldi nakatunud HeLa rakkude hulka hinnangulise vaatlusega). Kontsentreerimata viiruse tiitriks määrati $3,17 \times 10^1$ TCID₅₀/ml ja kontsentreerimise järgse viiruse tiitriks määrati $3,81 \times 10^3$ TCID₅₀/ml. Lisaks hinnati valgus- ja fluorestsentsmikroskoopia abil eGFP positiivsete HeLa rakkude hulka. Nakatunud HeLa rakud on tuvastatavad roheliselt fluorestseeruvate eGFP molekulide abil, mida ekspresseeritakse rakus viiruse translatsiooni järgselt. Joonisel 5 on näha nakatunud rakkude hulk kontsentreerimata ja kontsentreeritud viiruslahuste korral. Vaatlemisel on näha, et kontsentreerimata viirusega nakatunud rakkude hulk kõigist rakkudest (Joonis 5, A) oli märkimisväärselt madalam võrreldes kontsentreeritud viirusega nakatunud rakkude hulgaga (Joonis 5, B). Kontrollil ei tuvastatud ühtegi eGFP positiivset rakku (Joonis 5, C). Tiitrimiskatsete ja mikroskoopia katsed näitasid, et viiruse kontsentreerimine ultratsentrifuugimis-meetodil suurendas viiruslahuse nakatumisvõimet rohkem kui 100-kordselt.

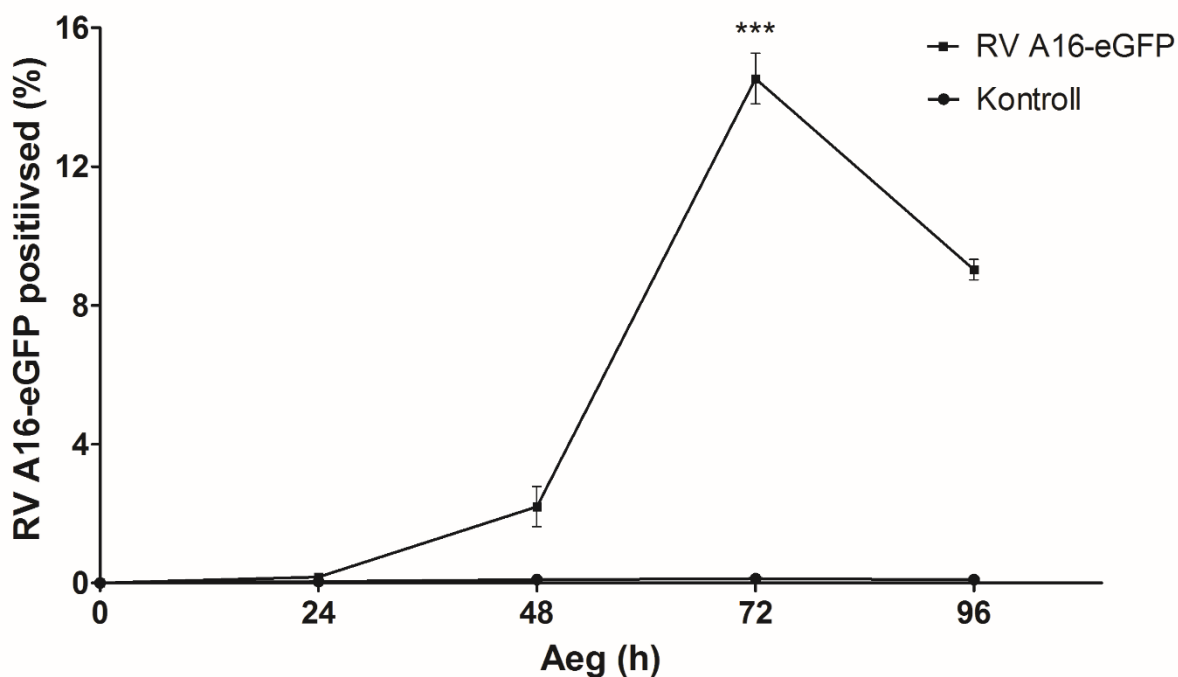


Joonis 5. HeLa rakud 48 h pärast RV A16-eGFP-ga nakatamist ning kontroll. HeLa rakke nakatati kontsentreerimata (A) või kontsentreeritud (B) RV A16-eGFP viirusega ning vaadeldi valgus- ja fluorestsentsmikroskoopia kombinatsioonil ning hinnati eGFP positiivsete rakkude hulka 48 h pärast nakatamist. Võrdluseks on kontroll nakatamata HeLa rakkudega (C). Skaala = 50 μm .

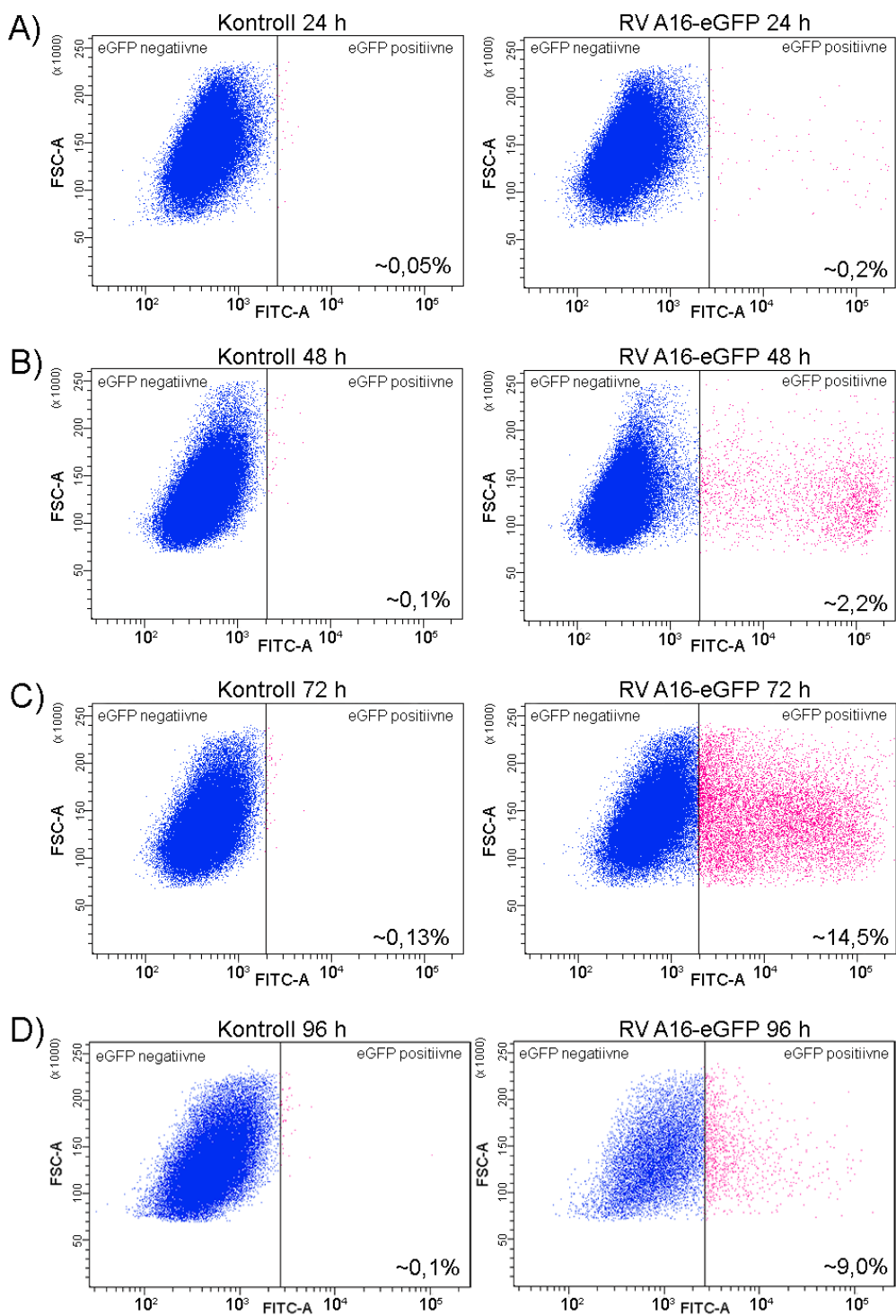
2.3.2. Rinoviirus A16-eGFP-ga nakatumise dünaamika analüüs

Viiruse tootmise optimeerimiseks tuli leida ajapunkt, mil viirusega nakatunud rakkude osakaal oleks suurim. Selleks analüüsiti läbivoolutsütomeetria meetodil eGFP signaali olemasolu ja intensiivsust RV A16-eGFP-ga nakatatud HeLa rakkudes (joonis 6 ja 7). Kontrolliks kasutati nakatamata HeLa rakke, millede abil mõõdeti autofluorestsentsi taset (joonis 7). Tulemused mõõdeti neljas ajapunktis pärast viirusega nakatamist. Jooniselt 6 on näha RV A16-eGFP positiivsete rakkude osakaalu muutust ajas. 24 tunni ajapunktis eGFP positiivsete rakkude hulk erineb väga vähesel määral võrreldes autofluorestsentsiga (joonis 6 ja 7 A), erinevus on märgata 48 tunni ajapunktis (joonis 6 ja 7 B). 72 tundi pärast RV A16-eGFP viirusega nakatamist on eGFP positiivsete rakkude osakaal suurim (joonis 6 ja 7 C) ning 96 tunni pärast on näha eGFP positiivsete rakkude osakaalu vähenemist (joonis 6 ja 7 D). Muuhulgas võib

joonise 7 D osas näha, et 96 tunni ajapunktis on elusate rakkude hulk väiksem võrreldes teiste ajapunktidega ning selle põhjuseks võib olla laialdane tsütopaatiliste efektide esinemine, mille tagajärjel rakud kärbuivad ning surevad. Kõike arvesse võttes otsustati jooniste 6 ja 7 alusel, et sobivaim ajapunkt viiruse kogumiseks ning säilitamiseks on 72 h pärast rakkude nakatamist.



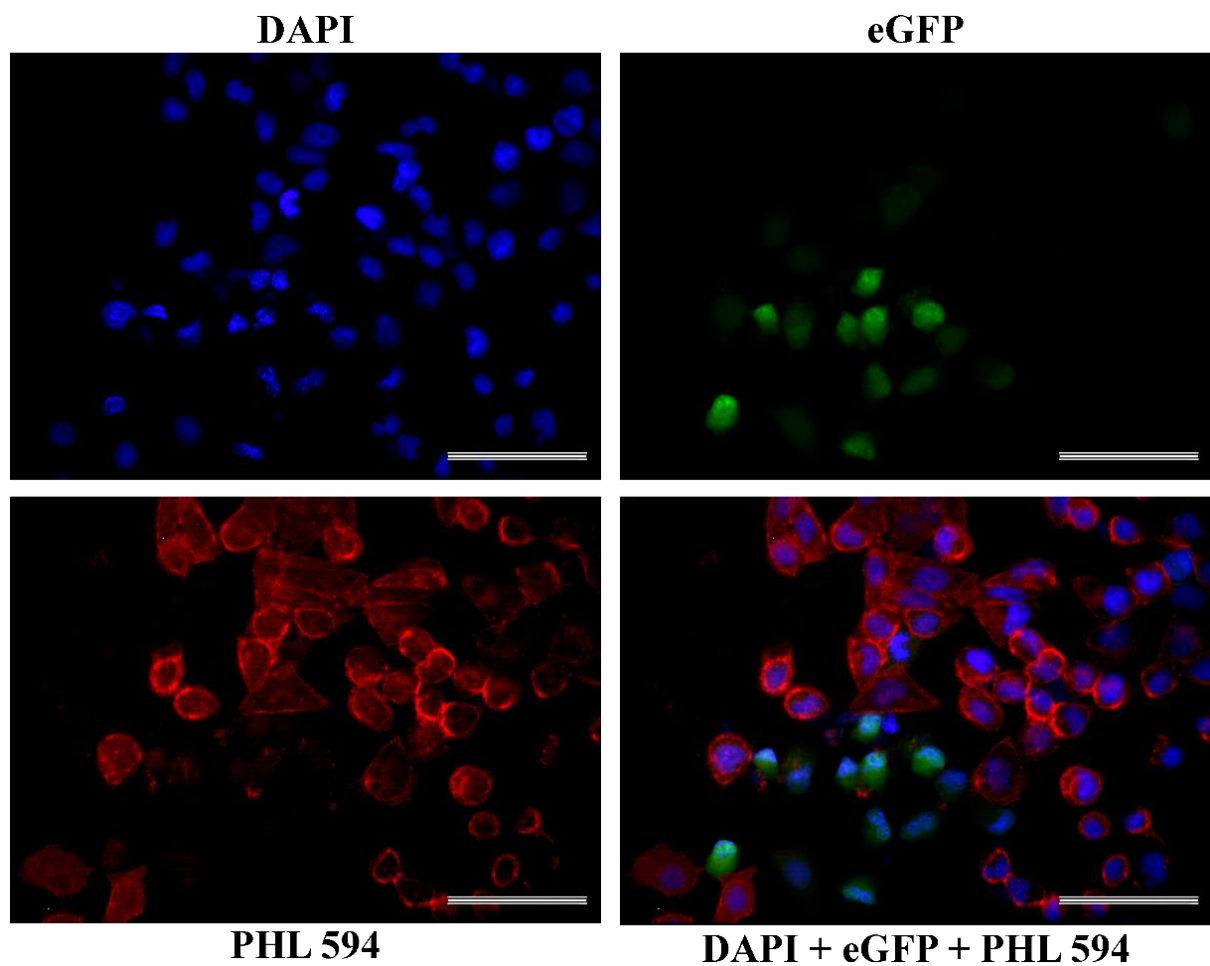
Joonis 6. RV A16-eGFP positiivsete rakkude osakaal erinevates ajapunktides pärast viirusega nakatamist. RV A16-eGFP viirusega nakatatud HeLa rakke analüüsiti läbivoolutsütomeetriga ning mõõdeti eGFP signaali olemasolu ning tugevust. Mõõtmised tehti 24, 48, 72 ja 96 tundi pärast RV A16-eGFP viirusega nakatamist, kontrollideks nakatamata rakud. Graafikul on esitatud tehtud mõõtmiste keskmised väärtused ajapunktide kaupa koos 95% usaldusvahemikuga. 24–72 h, n=2; 96 h, n=1. Joonisel kasutatakse järgnevat tähistust: *** $P < 0,001$.



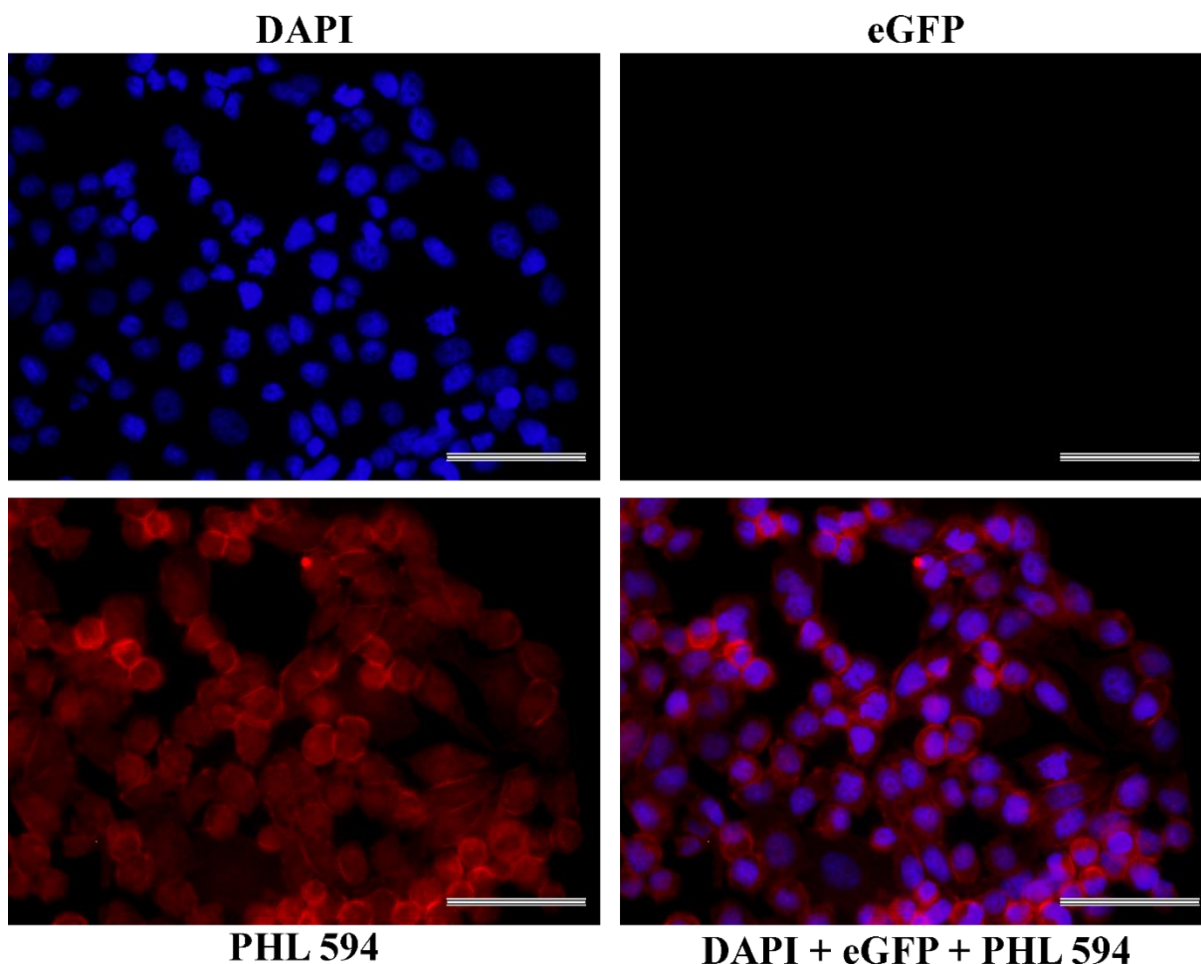
Joonis 7. eGFP signaali mõõtmistulemused erinevates ajapunktides pärast viirusega nakatamist. RV A16-eGFP viirusega nakatatud HeLa rakke analüüsiti läbivoolutsütomeetriga ning mõõdeti eGFP signaali olemasolu ning tugevust. Mõõtmised tehti (A) 24, (B) 48, (C) 72 ja (D) 96 tundi pärast RV A16-eGFP viirusega nakatamist. Graafikul on esitatud iga ajapunkti kohta ühe mõõtmise tulemuse *dot blot* nii kontrolli kui ka viirusega nakatatud rakkude kohta. Graafikule on lisatud eGFP positiivsete rakkude hulk protsendina vastavas ajapunktis.

2.3.3. RV A16-eGFP visualiseerimise meetodite võrdlus

Töö järgmiseks etapiks oli RV A16-eGFP replikatsioonitsentrite visualiseerimine HeLa rakkudes, milleks kasutati fluorestsentsmikroskoopiat. Vaadeldi lisaks eGFP signaalile rakkude üldist kuju ning nende suhtelist hulka. Rakkude kuju ja viirusosakeste visualiseerimiseks kasutati kahte erinevat meetodit. Esimesel meetodil (joonis 8A), kasutati rakkude tsütoskeleti visualiseerimiseks PHL toksiini, mis seondub filamentaarise aktiiniga ning on märgitud Alexa 594 fluorokroomiga (punane – $\lambda = 609$ nm). Raku DNA värviti siniseks DAPI-ga ($\lambda = 461$ nm), ning viirusega nakatunud rakkudes viiruse translatsiooni järgselt ekspresseeritavat eGFP valku on joonisel 8A näha roheliselt ($\lambda = 509$ nm). Kontrolliks olid viirusega nakatamata HeLa rakud. Jooniselt 8A on näha, et eGFP positiivsetes rakkudes on väga nõrk PHL 594 signaal võrreldes eGFP negatiivsete rakkude (joonis 8 A) ning kontrolliga (joonis 8 B). Nõrk või olematu PHL 594 signaal eGFP positiivsetes rakkudes ei võimalda vaadelda nende rakkude kuju, mistõttu vajab see meetod veel täiustamist või muutmist.

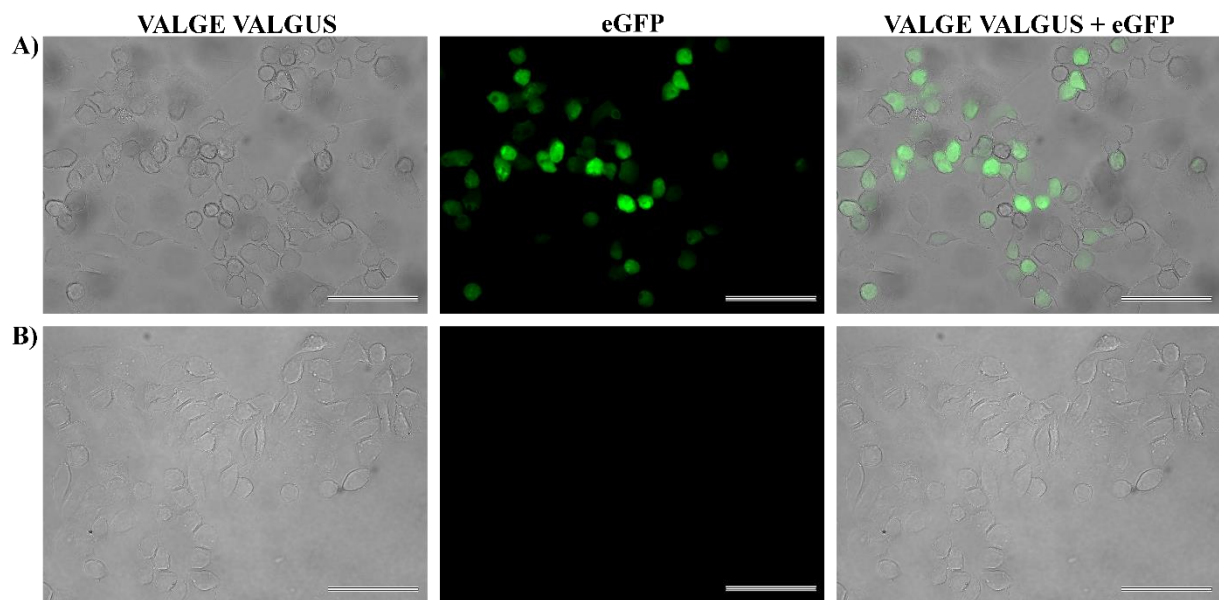


Joonis 8A. RV A16-eGFP-ga nakatatud HeLa rakkude fluorestsentsmikroskoopia DAPI ja PHL 594-ga. Rakke nakatati RV A16-eGFP viirusega ning vaadeldi fluorestsentsmikroskoobis 48 h pärast nakatamist. Rakutuumad on visualiseeritud siniselt (DAPI), filamentaarne aktiin on visualiseeritud punaselt (PHL 594) ning viirusega nakatunud rakud on näha eGFP valguga ekspressiooni tõttu roheliselt. Skaala = 50 μ m.



Joonis 8B. HeLa rakkude fluorestsentsmikroskoopia DAPI ja PHL 594 kontroll. Kontrollina vaadeldi rakke, mida RV A16-eGFP viirusega ei nakatatud. Rakutuumad on visualiseeritud siniselt (DAPI), filamentaarne aktiin on visualiseeritud punaselt (PHL 594). Kuna rakke viirusega ei nakatatud, siis eGFP positiivsed rakud puuduvad. Skaala = 50 μ m.

Teise meetodina kasutati valgus- ja fluorestsentsmikroskoopia kombinatsiooni. Valge valguse abil visualiseeriti rakkude kuju ning kuna viirusega nakatunud rakkudes ekspresseeritakse translatiooni järgselt eGFP valku, siis on nakatunud rakud näha roheliselt. Joonis 9 A osas on näha RV A16-eGFP-ga nakatatud rakud ning B osas viirusega nakatamata rakkudega kontroll. Võrreldes esimese meetodiga, kus kasutati rakkude kuju visualiseerimiseks PHL 594, on valgusmikroskoopia abil võimalik vaadelda kõigi rakkude kuju olenemata sellest, kas rakk on eGFP positiivne või negatiivne.



Joonis 9. HeLa rakkude fluorestsentsmikroskoopia valge valgusega. Rakke nakatati RV A16-eGFP viirusega ning vaadeldi valgus- ja fluorestsentsmikroskoopia kombinatsioonil 48 h pärast nakatamist. Viirusega nakatatud rakud on näha joonise A osas, kontroll nakatamata rakkudega B osas. Valgusmikroskoopia abil visualiseeritakse rakkude kuju ning viirusega nakatunud rakud on näha eGFP valgu ekspressiooni tõttu roheliselt. Skaala = 50 μ m.

2.4. ARUTELU

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärkideks olid eGFP-ekspresseeriva rinoviirus A16 kontsentratsiooni suurendamine, viiruse tootmistingimuste optimeerimine ning eGFP-ekspresseeriva rinoviirus A16 visualiseerimine HeLa rakkudes.

Viiruse kontsentratsiooni suurendamiseks kasutati ultratsentrifuugimise meetodit ning viiruse tiitrimise tulemused näitavad katse õnnestumist. Kontsentreerimata viiruse tiitriks määrati $3,17 \times 10^1$ TCID₅₀/ml ja kontsentreerimise järgse viiruse tiitriks $3,81 \times 10^3$ TCID₅₀/ml. See näitab rohkem kui 100-kordset viiruslahuse nakatumisvõime suurenemist. Katse õnnestumist kinnitavad ka valgus- ja fluorestsentsmikroskoopia tulemused. Kontsentreeritud viirusega HeLa rakke nakatades on näha suuremat hulka eGFP positiivseid rakke võrreldes kontsentreerimata viirusega nakatades. Tiitrimise ning fluorestsentsmikroskoopia tulemustest järeldati, et ultratsentrifuugimine on efektiivne meetod eGFP-ekspresseeriva rinoviirus A16 viiruse kontsentreerimiseks. Viiruslahuse suurenenud nakatumisvõime kontsentreerimise tagajärjel võimaldab edasistes eksperimentides rakke efektiivsemalt viirusega nakatada.

Kontsentreeritud eGFP-ekspresseeriva viiruse üheks väljundiks on viirusega nakatunud rakkude analüüsiks eGFP signaali järgi rakusorteringa vastavate rakkude välja sorteerimine ning sellega kindlustamine, et analüüsitakse viirusega nakatunud rakke. Lisaks tagab kontsentreeritud viirus üldiselt suurema nakatunud rakkude hulga ning see tegi ka käesolevas töös tehtud voolutsütomeetria ning fluorestsentsmikroskoopia eksperimentid mugavamaks ning ajasäästlikumaks, kuna korraga sai analüüsida rohkem nakatunud rakke. Siit ka väljund tulevikueksperimentideks, kus korraga on vaja analüüsida suurt hulka nakatunud rakke.

Teisena optimeeriti viiruslahuse tootmise protokoll. Selleks uuriti läbivoolutsütomeetri abil rakkude RV A16-eGFP nakatumise dünaamikat ning selle kirjeldamiseks mõõdeti viirusega nakatunud rakkude eGFP signaali intensiivsust. Katse tulemusel leiti, et eGFP positiivsete HeLa rakkude osakaal oli suurim 72 tundi pärast viirusega nakatamist. Seda teadmist rakendati viiruse edaspidises tootmises sobivaima ajapunktina viirusega nakatatud HeLa rakkude kogumiseks. Teadmine, millises ajapunktis on suurim eGFP positiivsete rakkude osakaal, aitab viirust koguda ja säilitada võimalikult kõrges kontsentratsioonis.

Lisaks saadi ka üldpilt viiruse nakatumise dünaamikast HeLa rakkudes. Näiteks katse viimases, 96 tunni ajapunktis oli märgata suurt elusrakkude hulga vähenemist, mis võib viitada nakatunud rakkudes tekkivate tsütopaatiliste efektide esinemisele, mille tagajärjel rakud kärbuvad ning surevad. Nakatumise dünaamika ja tsütopaatiliste efektide esinemise parem mõistmine muudab lihtsamaks teiste eksperimentide, näiteks fluorestsentsmikroskoopia katsete, jaoks sobiva ajapunkti määramise.

Töö viimaseks etapiks oli viiruse visualiseerimine HeLa rakkudes kasutades selleks valgus- ja fluorestsentsmikroskoopiat. Lisaks eGFP signaalile taheti vaadelda ka rakkude morfoloogiat ja viiruse replikatsioonitsentreid. Rakkude kuju ja viirusosakeste visualiseerimiseks kasutati kahte erinevat meetodit. Esimese meetodi puhul kasutati rakkude tsütoskeleti visualiseerimiseks toksiini PHL 594, mis seondub filamentaarse aktiiniga, ja DNA visualiseerimiseks DAPI-t. Viiruse teeb nähtavaks translatsiooni järgselt ekspresseeritav eGFP valk. Kahjuks ei töötanud esimene meetod meie katsetes soovitud, kuna tugevalt eGFP positiivsetes rakkudes on PHL 594 signaal väga nõrk või puudus. PHL 594 nõrga või puuduliku signaali üheks põhjuseks võis olla viirusinfektsiooni tagajärjel tekkivate tsütopaatiliste efektide ehk struktuursete muutuste esinemine peremeesrakus.

On kirjeldatud, et rinoviiruse infektsiooni lõppfaasis toimub HeLa rakkudes tsütokeratiin 8 lõhustamine viiruse proteaasi 2A poolt (Seipelt *et al.*, 2000). Tsütokeratiinid on intermediaarsed filamendid, mis koos aktiini filamentide ja mikrotuubulitega moodustavad tsütoskeleti. Tsütokeratiinide lõhustumine toob kaasa tõsised muutused tsütoskeletis (Chen *et al.*, 1993; Seipelt *et al.*, 2000). See võibki olla üheks põhjuseks, miks filamentaarset aktiini värviva PHL 594 signaali eGFP positiivsetes rakkudes näha ei ole. Valgus- ja fluorestsentsmikroskoopia kombinatsioon, mida kasutati teise meetodina viiruse visualiseerimiseks HeLa rakkudes, osutus heaks meetodiks nakatunud rakkude hulga ning kuju hindamiseks, ent ei kirjelda rakumorfoloogiat piisavalt detailset.

Nendel põhjustel jäi algselt püstitatud eesmärkidest täitmata viiruse replikatsioonitsentrite visualiseerimise meetodi välja töötamine HeLa rakkudes. Madala või puuduliku PHL 594 signaali tugevuse tõttu eGFP positiivsetes rakkudes ei saanud hinnata viirusega nakatunud rakkude morfoloogiat. Selle põhjuse kindlaks määramiseks oleks vaja teha täiendavaid katseid. Valgus- ja fluorestsentsmikroskoopia kombinatsioonil oli seevastu kõikide rakkude kuju nähtav ning eGFP positiivsete rakkude eristamine eGFP negatiivsetest ei valmistanud raskusi, ent kahjuks ei saa seda lugeda eesmärgi täitmiseks. Valgusmikroskoopia abil rakkude

visualiseerimine ei sobi tulevaste eesmärkide realiseerimiseks, kuna rakumorfoloogiat ei ole võimalik piisavalt detailselt vaadelda. Viiruse replikatsioonitsentrite visualiseerimiseks HeLa rakkudes on vajalik raku palju detailsem visualiseerimine kui vaid raku kuju iseloomustamine. Seetõttu jääb tööks püsitud eesmärk veel püsima ning katsetatud fluorestsentsmikroskoopia meetodit tuleb kas täiustada või muuta. Töötades välja efektiivse meetodi rakumorfoloogia visualiseerimiseks saab liikuda replikatsioonitsentrite visualiseerimise tööga edasi ning järgnev etapp võiks olla konfokaalmikroskoopia meetodi katsetamine eGFP signaali täpseks lokaliseerimiseks HeLa rakkudes.

Kokkuvõttes optimeeriti käesoleva bakalaureuse töö tulemusena meetodid A16-eGFP viiruse tootmiseks ja visualiseerimiseks HeLa rakkudes. Lisaks näidati, et A16-eGFP viiruspositiivsete rakkude hulka on võimalik kvantitatiivselt analüüsida voolutsütomeetrial. Nimetatud katsed on aluseks edasistele funktsionaalsetele uuringutele, kus on vajalik hinnata rinoviirusega nakatumise efektiivsust.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö üheks eesmärgiks oli eGFP-ekspresseeriva rinoviirus A16 kontsentratsiooni suurendamine. Rinoviirus A16-eGFP saadi plasmiidist pA16-eGFP sünteesitud viirusliku RNA-ga HeLa rakkude transfekteerimise tulemusel. Kontsentreerimiseks kasutati ultratsentrifuugimise meetodit. Töö tulemusena suurendati viiruslahuse nakatumisvõimet 100-korda võrreldes algse kontsentreerimata viiruslahusega.

Töö teiseks eesmärgiks oli RV A16-eGFP tootmistingimuste optimeerimine, et viirust oleks võimalik toota võimalikult kõrges kontsentratsioonis. Selleks analüüsiti rakkude nakatumise dünaamikat ning leiti ajapunkt, kus viirusega nakatunud rakkude osakaal on suurim. Tulemustest lähtuvalt on viiruse kogumiseks sobivaim ajapunkt 72 tundi pärast viirusega nakatamist, mil eGFP positiivsete rakkude osakaal oli nelja ajapunkti lõikes suurim.

Viimaseks eesmärgiks püstitati eGFP-ekspresseeriva viiruse visualiseerimine HeLa rakkudes. Fluorestsentsmikroskoopias kasutatud toksiini PHL 594 abil ei olnud võimalik hinnata eGFP positiivsete rakkude morfoloogiat ning selle põhjuse välja selgitamiseks oleks vajalik teha täiendavaid katseid. Valgus- ja fluorestsentsmikroskoopia kombinatsioon, mida kasutati visualiseerimise teise meetodina, oli sobiv meetod eGFP positiivsete rakkude eristamiseks eGFP negatiivsetest rakkudest, ent rakumorfoloogiat ei ole selle meetodiga võimalik piisavalt detailselt kirjeldada.

Töös püstitatud peamised eesmärgid viiruse kontsentreerimise ning tootmistingimuste optimeerimise näol said täidetud ning see võimaldab rinoviirus A16-eGFP edasist kasutust uurimisgrupi tulevastes eksperimentides.

Concentration of eGFP-expressing Rhinovirus A16 and Optimization of the Virus Production Conditions in the HeLa Cell Line

Karl Mitt

SUMMARY

Human rhinoviruses are small single-stranded positive sense RNA viruses that can cause a variety of health problems including upper respiratory tract illnesses. In addition, rhinoviruses are associated with lower respiratory tract complications such as bronchitis, pneumonia, and exacerbation of asthma.

One objective of this work was to increase the concentration of eGFP-expressing rhinovirus A16. Rhinovirus A16-eGFP was the result of HeLa cell transfection with viral RNA synthesized from pA16-eGFP plasmid done prior to this work. Concentration of the virus was done using ultracentrifugation method and it turned out to be a success. As a result TCID₅₀/ml value was increased 100 folds compared with the initial nonconcentrated virus.

The second goal of the work was to optimize the conditions for viral production so that the virus could be produced with the highest concentration possible. To achieve that, the infection dynamics in HeLa cells were analyzed to find the time point where the percentage of infected cells was highest. The work resulted with a fitting time point for collecting and storing the virus. The 72-hour time point after infecting the cells was found to have the highest percentage of eGFP positive cells out of all the time points.

The last objective was to visualize eGFP-expressing rhinovirus in HeLa cells. With the usage of Alexa Fluor® 594 phalloidin, it was unable to evaluate the cell morphology of eGFP positive cells since the signal was too weak. More experiments are needed to be done in order to find out the cause of the problem. The method of combining light and fluorescence microscopy was suitable method for distinction of eGFP positive and negative cells, but was not sufficient to see the cell morphology in high enough detail.

The main objectives that were set for this work in terms of concentrating the eGFP-expressing rhinovirus A16 and optimizing the conditions of viral production were fulfilled and this allows the use of rhinovirus A16-eGFP in future experiments.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada eelkõige oma juhendajaid Alar Aabi ja Reet Kurge. Suurimad tänusõnad lähevad Alar Aabile ja Helen Hermannile, kes olid minu töö juures suurimad abistajad ning nõustajad. Tahan tänada veel teisi RNA bioloogia uurimisgrupi liikmeid, kes aitasid mind minu töös, eriti Ana Rebast, Anet Kivihalli, Egon Urgardi ja Merit Müüri. Samuti olen tänulik James E. Gernile ja Yuri A. Bochkovile, kellelt meie uurimisgrupp sai kingitusena pA16-eGFP plasmidi.

KASUTATUD KIRJANDUS

A) Ajakirjad

Andries, K., Dewindt, B., Snoeks, J., Wouters, L., Moereels, H., Lewi, P. J., *et al.* 1990. Two groups of rhinoviruses revealed by a panel of antiviral compounds present sequence divergence and differential pathogenicity. *J. Virol.*, 64: 1117–23.

Arnold, E., Luo, M., Vriend, G., Rossmann, M. G., Palmenberg, A. C., Parks, G.D., *et al.* 1987. Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84: 21–25.

Bayer, N., Schober, D., Huttinger, M., Blaas, D. ja Fuchs, R. 2001. Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype 2 cell entry. *J. Biol. Chem.*, 276: 3952–3962.

Bella, J. ja Rossmann, M. G. 1999. Review: rhinoviruses and their ICAM receptors. *J. Struct. Biol.*, 128: 69–74.

Bochkov, Y. A. ja Gern, J. E. 2012. Clinical and molecular features of human rhinovirus C. *Microbes Infect*, 14: 485–494. Bochkov, Y. A. ja Gern, J. E. 2016. Rhinoviruses and Their Receptors: Implications for Allergic Disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 16: 1–11.

Bochkov, Y. A., Watters, K., Ashraf, S., Griggs, T. F., Devries, M. K., Jackson, D. J., *et al.* 2015. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112: 5485–5490.

Briese, T., Palacios, G., Kokoris, M., Jabado, O., Liu, Z., Renwick, N., *et al.* 2005. Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, 11: 310–313.

Brown, D. M., Cornell, C. T., Tran, G. P., Nguyen, J. H. C. ja Semler, B. L. 2005. An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J. Virol.*, 79: 11962–11973.

Bush, R., Busse, W. W., Flaherty, D., Warshauer, D., Dick, E. ja Reed, C. 1978. Effects of experimental rhinovirus 16 infection on airways and leukocyte function in normal subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 61: 80–87.

Busse, W. W. ja Gern, J. E. 1997. Viruses in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 100: 147–150.

Calhoun, W. J., Dick, E. C., Schwartz, L. B. ja Busse, W. W. 1994. A common cold virus, rhinovirus 16, potentiates airway inflammation after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *J. Clin. Invest.*, 94: 2200–2208.

Chen, P. H., Ornelles, D. A. ja Shenk, T. 1993. The adenovirus L3 23-kilodalton proteinase cleaves the amino-terminal head domain from cytokeratin 18 and disrupts the cytokeratin network of HeLa cells. *J. Virol.*, 67: 3507–14.

Colonno, R. J., Condra, J. H., Mizutani, S., Callahan, P. L., Davies, M. E. ja Murcko, M. A. 1988. Evidence for the direct involvement of the rhinovirus canyon in receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 5449–5453.

- Dougherty, R. H. ja Fahy, J. V. 2009. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. *Clin. Exp. Allergy*, 39: 193–202.
- Fendrick, A. M., Monto, A. S., Nightengale, B. ja Sarnes, M. 2003. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *JAMA Intern. Med.*, 163: 487–494.
- Fuchs, R. ja Blaas, D. 2010. Uncoating of human rhinoviruses. *Rev. Med. Virol.*, 20: 281–297.
- Gavala, M., Bertics, P. J. ja Gern, J. E. 2012. Rhinoviruses, allergic inflammation, and asthma. *Immunol Rev*, 242: 69–90.
- Gern, J. E. 2010. The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma. *J. Virol.*, 84: 7418–7426.
- Gern, J. E. ja Busse, W. W. 1999. Association of rhinovirus infections with asthma. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 9–18.
- Glanville, N. ja Johnston, S. L. 2015. Challenges in developing a cross-serotype rhinovirus vaccine. *Curr. Opin. Virol.*, 11: 83–88.
- Greve, J. M., Davis, G., Meyer, A. M., Forte, C. P., Yost, S. C., Marlor, C. W., *et al.* 1989. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*, 56: 839–847.
- Grunert, H. P., Wolf, K. U., Langner, K. D., Sawitzky, D., Habermehl, K. O. ja Zeichhardt, H. 1997. Internalization of human rhinovirus 14 into HeLa and ICAM-1-transfected BHK cells. *Med. Microbiol. Immunol.*, 186: 1–9.
- Grünberg, K., Timmers, M. C., De Klerk, E. P. A., Dick, E. C. ja Sterk, P. J. 1999. Experimental rhinovirus 16 infection causes variable airway obstruction in subjects with atopic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160: 1375–1380.
- Gubler, U. ja Hoffman, B. J. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 25: 263–269.
- Hamparian, V. V., Colonno, R. J., Cooney, M. K., Dick, E. C., Gwaltney, J. M., Hughes, J. H., *et al.* 1987. A collaborative report: rhinoviruses--extension of the numbering system from 89 to 100. *Virology*, 159: 191–192.
- Hayden, F. G., Albrecht, J. K., Kaiser, D. L. ja Gwaltney, J. M. 1986. Prevention of natural colds by contact prophylaxis with intranasal alpha 2-interferon. *N. Engl. J. Med.*, 314: 71–75.
- Hayden, F. G., Turner, R. B., Gwaltney, J. M., Chi-Burris, K., Gersten, M., Hsyu, P., *et al.* 2003. Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled studies of rupintrivir nasal spray 2-percent suspension for prevention and treatment of experimentally induced rhinovirus colds in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 3907–3916.
- Hendley, J. O. ja Gwaltney, J. M. 1988. Mechanisms of transmission of rhinovirus infections. *Epidemiol. Rev.*, 10: 242–258.
- Hendley, J. O., Wenzel, R. P. ja Gwaltney, J. M. 1973. Transmission of rhinovirus colds by self-inoculation. *N. Engl. J. Med.*, 288: 1361–1364.

- Hewat, E. A., Neumann, E., Conway, J. F., Moser, R., Ronacher, B., Marlovits, T. C., *et al.* 2000. The cellular receptor to human rhinovirus 2 binds around the 5-fold axis and not in the canyon: a structural view. *EMBO J.*, 19: 6317–6325.
- Heymann, P. W. 2015. Developing strategies to treat asthma exacerbations caused by rhinovirus. *EBioMedicine*, 2: 11–12.
- Hofer, F., Gruenberger, M., Kowalski, H., Machat, H., Huettinger, M., Kuechler, E., *et al.* 1994. Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 1839–1842.
- Hulpiau, P. ja van Roy, F. 2009. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41: 349–369.
- Hung, M., Gibbs, C.S. ja Tsiang, M. 2002. Biochemical characterization of rhinovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.*, 56: 99–114.
- Jackson, D. J., Makrinioti, H., Rana, B. M. J., Shamji, B. W. H., Trujillo-Torralbo, M. B., Footitt, J., *et al.* 2014. IL-33-Dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 190: 1373–1382.
- Jacobs, S. E., Lamson, D. M., Kirsten, S. ja Walsh, T. J. 2013. Human rhinoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.*, 26: 135–162.
- Jacobson, M. F. ja Baltimore, D. 1968. Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with coat protein. *J. Mol. Biol.*, 33: 369–378.
- Jennings, L. C. ja Dick, E. C. 1987. Transmission and control of rhinovirus colds. *Eur. J. Epidemiol.*, 3: 327–335.
- Johnston, S. L., Pattemore, P., Sanderson, G., Smith, S., Campbell, M., Josephs, L., *et al.* 1996. The relationship between upper respiratory infections and hospital admissions for asthma; a time trend analysis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 154: 654–660.
- Johnston, S. L., Pattemore, P. K., Sanderson, G., Smith, S., Lampe, F., Josephs, L., *et al.* 1995. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ*, 310: 1225–1229.
- Katpally, U. ja Smith, T. J. 2007. Pocket factors are unlikely to play a major role in the life cycle of human rhinovirus. *J. Virol.*, 81: 6307–6315.
- Kennedy, J. L., Turner, R. B., Braciale, T., Heymann, P. W. ja Borish, L. 2012. Pathogenesis of rhinovirus infection. *Curr. Opin. Virol.*, 2: 287–293.
- Kolatkar, P. R., Bella, J., Olson, N. H., Bator, C. M., Baker, T. S. ja Rossmann, M. G. 1999. Structural studies of two rhinovirus serotypes complexed with fragments of their cellular receptor. *EMBO J.*, 18: 6249–6259.
- Lambrecht, B. N. ja Hammad, H. 2014. The immunology of asthma. *Nat. Immunol.*, 16: 45–56.

- Lamson, D., Renwick, N., Kapoor, V., Liu, Z., Palacios, G., Ju, J., *et al.* 2006. MassTag polymerase chain reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza like illness in New York State during 2004–2005. *J. Infect. Dis.*, 194: 1398–1402.
- Lee, W. M., Monroe, S. S. ja Rueckert, R. R. 1993. Role of maturation cleavage in infectivity of picornaviruses: activation of an infectosome. *J. Virol.*, 67: 2110–2122.
- Lee, W.-M. ja Wang, W. 2003. Human rhinovirus type 16: mutant V1210A requires capsid-binding drug for assembly of pentamers to form virions during morphogenesis. *J. Virol.*, 77: 6235–6244.
- Lee, W. M., Wang, W. ja Rueckert, R. R. 1995. Complete sequence of the RNA genome of human rhinovirus 16, a clinically useful common cold virus belonging to the ICAM-1 receptor group. *Virus Genes*, 9: 177–181.
- Lemanske, R. F. J., Dick, E. C., Swenson, C., Vrtis, R. F. ja Busse, W. W. 1989. Rhinovirus upper respiratory infection increases airway hyperreactivity and late asthmatic reactions. *J. Clin. Invest.*, 83: 1–10.
- Lin, J.-Y., Chen, T.-C., Weng, K.-F., Chang, S.-C., Chen, L.-L. ja Shih, S.-R. 2009. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J. Biomed. Sci.*, 16: 103.
- McIntyre, C. L., Knowles, N. J. ja Simmonds, P. 2013. Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. *J. Gen. Virol.*, 94: 1791–1806.
- Mäkelä, M. J., Puhakka, T., Ruuskanen, O., Saikku, P., Kimpimäki, M., Blomqvist, S., *et al.* 1998. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold these include: Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 539–542.
- Nicholson, K. G., Kent, J. ja Ireland, D. C. 1993. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ*, 307: 982–986.
- Nykjaer, A. ja Willnow, T. E. 2002. The low-density lipoprotein receptor gene family: A cellular Swiss army knife? *Trends Cell Biol.*, 12: 273–280.
- Palmenberg, A. C. 1982. In vitro synthesis and assembly of picornaviral capsid intermediate structures. *J. Virol.*, 44: 900–906.
- Palmenberg, A. C. ja Gern, J. E. 2015. Classification and evolution of human rhinoviruses. *Methods Mol. Biol.*, 1221: 1–10.
- Palmenberg, A. C., Rathe, J. A. ja Liggett, S. B. 2010. Analysis of complete genome sequences of human rhinovirus. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 125: 1190–1201.
- Palmenberg, A. C., Spiro, D., Kuzmickas, R., Wang, S., Djikeng, A., Rathe, J. A, *et al.* 2009. Sequencing and analyses of all reveal structure and evolution. *Science* (80-.), 324: 55–60.
- Paul, A. V, van Boom, H. J., Filippov, D. ja Wimmer, E. 1998. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*, 393: 280–284.
- Pestova, T. V, Hellen, C. U. ja Shatsky, I. N. 1996. Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 6859–6869.

- Reed, S. E. 1975. An investigation of the possible transmission of Rhinovirus colds through indirect contact. *J. Hyg. (Lond.)*, 75: 249–258.
- Reithmayer, M., Reischl, A., Snyers, L. ja Blaas, D. 2002. Species-specific receptor recognition by a minor-group human rhinovirus (HRV): HRV serotype 1A distinguishes between the murine and the human low-density lipoprotein receptor. *J. Virol.*, 76: 6957–6965.
- Seipelt, J., Liebig, H.D., Sommergruber, W., Gerner, C. ja Kuechler, E. 2000. 2A proteinase of human rhinovirus cleaves cytokeratin 8 in infected HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 20084–20089.
- Simmonds, P., McIntyre, C., Savolainen-Kopra, C., Tapparel, C., Mackay, I. M. ja Hovi, T. 2010. Proposals for the classification of human rhinovirus species C into genotypically assigned types. *J. Gen. Virol.*, 91: 2409–2419.
- Singh, M. ja Das, R. R. 2012. Zinc for the common cold. *Evidence-Based Child Heal.*, 7: 1235–1308.
- Snyers, L., Zwickl, H. ja Blaas, D. 2003. Human rhinovirus type 2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.*, 77: 5360–5369.
- Turner, R. B. 2005. New considerations in the treatment and prevention of rhinovirus infections. *Pediatr. Ann.*, 34: 53–7.
- van de Stolpe, A. ja van der Saag, P. T. 1996. Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.*, 74: 13–33.
- Wang, L. T. ja Smith, D. L. 2005. Capsid structure and dynamics of a human rhinovirus probed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Protein Sci.*, 14: 1661–1672.

B) Raamatud

- Cornell, C. T. ja Semler, B. L. 2006. Gene Expression and Replication of Picornaviruses, p 93–117. In R. A. Meyers (ed.), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim.
- Gern, J. E. ja Palmenberg, A. C. 2013. Rhinoviruses, p 1689–1699. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 6th ed., vol. 1. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Helenius, A. 2013. Virus Entry and Uncoating. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 6th ed., vol. 1. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Racaniello, V. R. 2013. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 6th ed., vol. 1. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Turner, R. B. 2009. Rhinovirus, p 1063–1082. In D. D. Richman, R. J. Whitley and F. G. Hayden (ed.), *Clinical Virology*, 3rd ed., ASM Press, Washington, D.C.

LIHTLITSENTS

Mina, Karl Mitt (sünnikuupäev: 30.05.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„eGFP märgistatud rinoviirus A16 kontsentreerimine, tootmistingimuste optimeerimine HeLa rakuliinis ning viirusega nakatunud rakkude visualiseerimine“,

mille juhendajateks on Alar Aab ja Reet Kurg,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016